

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik mit Friedrich-Baur-Institut

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Identifizierung und Charakterisierung  
der ursächlichen Genmutation einer Form  
der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Martin

aus

Dachau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Senderek

Mitberichterstatter: PD Dr. Christoph Lücking  
PD Dr. Angela Abicht

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Rolf Stucka

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2019

---

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
1. Zusammenfassung .....	7
2. Einleitung .....	9
2.1 Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT) .....	9
2.2 Demyelinisierende und axonale Formen der CMT .....	9
2.3 Genetik der CMT .....	10
2.4 Axonaler Transport, Dynactin und ACTR1A .....	11
3. Ziele der Arbeit .....	13
4. Patienten .....	14
5. Materialien und Methoden .....	16
5.1 Molekulargenetische Methoden .....	16
5.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	16
5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion .....	16
5.1.3 DNA-Sequenzanalyse mit der Sanger-Methode .....	17
5.1.4 DNA-Sequenzanalyse mit <i>whole-exome</i> -Sequenzierung .....	17
5.1.5 Segregationsanalyse in der Familie A und <i>ACTR1A</i> -Mutationssuche in weiteren CMT2-Familien .....	18
5.1.6 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Amplifikation der Leserahmen von <i>ACTR1A</i> und <i>DCTN2</i> .....	18
5.1.7 Einfügen der Mutation p.N133D durch <i>overlap-extension</i> -PCR .....	19
5.1.8 Klonierung von PCR-Fragmenten in TOPO-TA-Vektoren .....	20
5.1.9 Restriktionsverdau und Ligation in pCMV-Vektoren .....	20
5.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	21
5.1.11 Bakterienkultur .....	21
5.2 Zellkultur .....	22
5.2.1 Kultivierung der Zellen .....	22
5.2.2 Transiente Transfektionen .....	22
5.2.3 Differenzierung von Neuro-2a-Zellen .....	23

---

5.3	Proteinchemische Methoden .....	23
5.3.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	23
5.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot .....	23
5.3.3	Co-Immunpräzipitation .....	24
5.4	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	25
5.5	Auswertung der Immunfluoreszenz-Bilder von Neuro-2a-Zellen .....	25
5.6	<i>In silico</i> -Charakterisierung der ACTR1A p.N133D-Variante .....	26
6.	Ergebnisse .....	27
6.1	Identifizierung der wahrscheinlich krankheitsverursachenden Mutation .....	27
6.1.1	Identifizierung und Eingrenzung von Kandidatengenomen.....	27
6.1.2	Sequenzierung des <i>ACTR1A</i> -Gens bei weiteren CMT2-Patienten .....	29
6.2	Charakterisierung der <i>ACTR1A</i> -Variante c.397A>G (p.N133D).....	29
6.2.1	Einfluss der Mutation auf die Menge des ACTR1A-Proteins in Zellen .....	29
6.2.2	Lokalisation der ACTR1A p.N133D-Mutante in Zellen .....	31
6.2.3	Bindung von ACTR1A an DCTN2.....	33
6.2.4	Einfluss von ACTR1A auf die Differenzierung von Neuro-2a-Zellen .....	34
7.	Diskussion und Ausblick.....	39
7.1	Die ACTR1A-Variante p.N133D als mögliche Ursache einer CMT2.....	39
7.2	Plausibilität des Kandidatengens <i>ACTR1A</i> und der p.N133D-Variante .....	40
7.3	Auswirkungen der p.N133D-Variante auf das ACTR1A-Protein .....	41
7.4	Einfluss von ACTR1A auf die Neuritenbildung von Neuro-2a-Zellen .....	41
7.5	Gestörter axonaler Transport als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen .....	42
8.	Literaturverzeichnis.....	43
9.	Elektronische Datenbanken und Internetressourcen .....	50
10.	Anhang .....	51
10.1	Primer-Sequenzen .....	51
10.2	Verwendete Antikörper .....	53
10.3	Ergebnisse der <i>whole-exome</i> -Sequenzierung .....	54
10.4	<i>In silico</i> -Vorhersagen zur Pathogenität der ACTR1A p.N133D-Variante.....	55

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Dynactin-Komplexes .....	11
Abb. 2: Stammbaum der Familie A.....	14
Abb. 3: Identifizierung einer <i>ACTR1A</i> -Variante in einer CMT2-Familie.....	28
Abb. 4: <i>ACTR1A</i> -Proteinmengen in primären Fibroblasten .....	30
Abb. 5: Myc- <i>ACTR1A</i> -Proteinmengen in transfizierten Zellen.....	31
Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation von <i>ACTR1A</i> in primären Fibroblasten .....	32
Abb. 7: Subzelluläre Lokalisation von Myc- <i>ACTR1A</i> in transfizierten Zellen .....	33
Abb. 8: Co-Immunpräzipitation von Myc- <i>ACTR1A</i> und HA-DCTN2 .....	34
Abb. 9: Differenzierung von Neuro-2a-Zellen und Lokalisation von Myc- <i>ACTR1A</i> .....	35
Abb. 10: Anteil von Neuro-2a-Zellen mit neuritenartigen Ausläufern .....	36
Abb. 11: Länge des längsten neuritenartigen Ausläufers differenzierter Neuro-2a-Zellen ....	37
Abb. 12: Verzweigungen neuritenartiger Zellausläufer differenzierter Neuro-2a-Zellen .....	38
Abb. 13: Anzahl neuritenartiger Zellausläufer differenzierter Neuro-2a-Zellen .....	38

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: PCR-Programm.....	18
Tab. 2: Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	19
Tab. 3: Reaktionsansatz zur Amplifikation des <i>ACTRIA</i> - und <i>DCTN2</i> -Leserahmens .....	19
Tab. 4: PCR-Programm zur Amplifikation des <i>ACTRIA</i> - und <i>DCTN2</i> -Leserahmens .....	19
Tab. 5: Restriktionsverdau .....	21
Tab. 6: Programm einer Kolonie-PCR.....	22

## 1. Zusammenfassung

Bei der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT, oft synonym verwendet: Hereditäre motorische und sensible Neuropathie, HMSN) handelt es sich um eine klinisch und genetisch heterogene erbliche Erkrankung des peripheren Nervensystems, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten erheblich einschränken kann. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Genen bekannt (> 80), in denen Mutationen eine CMT zur Folge haben können. Der Nachweis des verantwortlichen Gendefekts ist derzeit jedoch längst nicht bei jedem Patienten möglich, sodass von der Existenz weiterer, bislang unbekannter Krankheitsgene auszugehen ist.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer vier Generationen umfassenden Familie, in der zwölf Personen von einer autosomal-dominant vererbten CMT vom axonalen Typ (CMT2) betroffen waren, die bislang unbekannte krankheitsverursachende Genvariante nachzuweisen. Des Weiteren sollte mit molekular- und zellbiologischen Untersuchungen der Versuch unternommen werden, die funktionellen Konsequenzen des genetischen Defekts aufzuklären.

Mittels *whole-exome*-Sequenzierung bei drei betroffenen Familienmitgliedern und Segregationsanalysen unter Einbeziehung weiterer Angehöriger wurden mögliche ursächliche Varianten auf die heterozygote *missense*-Variante c.397A>G (p.N133D) im *ACTR1A*-Gen eingegrenzt. Mutationen in diesem Gen waren bisher noch nicht in Zusammenhang mit einer CMT beschrieben worden. Unter 89 CMT2-Patienten ohne bekannte genetische Diagnose, die nicht miteinander oder mit der initial untersuchten Familie verwandt waren, konnten keine weiteren Fälle mit eindeutig pathogenen *ACTR1A*-Varianten identifiziert werden.

Das ACTR1A-Protein weist große Ähnlichkeit mit Aktin auf und ist Bestandteil des Dynactin-Komplexes, der an der Regulation intrazellulärer Transportprozesse beteiligt ist. Die p.N133D-Variante verändert einen in der Evolution stark konservierten Aminosäurerest, wird von bioinformatischen Algorithmen als pathogen beurteilt und betrifft den Abschnitt des ACTR1A-Proteins, der für die Interaktion mit DCTN2, einem weiteren Bestandteil des Dynactin-Komplexes, verantwortlich ist. Untersuchungen im Hinblick auf einen möglichen Einfluss der Variante auf Eigenschaften und Funktion von ACTR1A zeigten jedoch für Expressionslevel, subzelluläre Lokalisation und Bindung an DCTN2 keine erkennbaren Unterschiede zwischen Wildtyp- und mutiertem Protein.

In transfizierten Neuro-2a-Neuroblastomzellen führt Wildtyp-ACTR1A unter Differenzierungsbedingungen dazu, dass mehr Zellen neuritenartige Zellausläufer bilden, die Anzahl derartiger Fortsätze pro Zelle erhöht ist und die Ausläufer in größerem Ausmaß Verzweigungen aufweisen. Ein Einfluss auf die Länge der einzelnen Fortsätze war nicht erkennbar. Mutiertes p.N133D-ACTR1A zeigte ähnliche Auswirkungen, allerdings fand sich gegenüber dem Wildtyp-Protein ein abgeschwächter Effekt darauf, ob differenzierte Neuro-2a-Zellen einen oder mehrere neuritenartige Ausläufer pro Zelle ausbilden.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der genetischen Untersuchung in einer großen CMT2-Familie auf die pathogenetische Relevanz der beschriebenen *ACTRIA*-Variante hin. Diese Schlussfolgerung wird teilweise durch die in differenzierten Neuro-2a-Zellen gewonnenen Ergebnisse unterstützt. Auch Überlegungen zur Art der Mutation (Änderung eines konservierten Aminosäurerests) und die bekannte Bedeutung des Dynactin-Komplexes in Neuronen (unter anderem für den axonalen Transport) lassen die *ACTRIA*-Variante als krankheitsverursachende Mutation plausibel erscheinen. Andererseits war es bisher nicht möglich, bei weiteren Neuropathie-Patienten *ACTRIA*-Mutationen nachzuweisen oder einen Effekt der p.N133D-Variante auf Eigenschaften des ACTR1A-Proteins experimentell zu belegen. Somit ist eine Rolle von ACTR1A in der Pathogenese erblicher Neuropathien zwar als wahrscheinlich anzunehmen, jedoch noch nicht abschließend bewiesen.



## 2. Einleitung

### 2.1 Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT)

Die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT, oft synonym verwendet: Hereditäre motorische und sensible Neuropathie, HMSN) ist eine Erkrankung der peripheren Nerven und der zugehörigen Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks und der sensiblen Neurone in den Spinalganglien [1]. Frühe Beschreibungen des klinisch und genetisch heterogenen Krankheitsbilds stammen aus dem 19. Jahrhundert, unter anderem von Jean-Martin Charcot und Pierre Marie sowie unabhängig davon von Howard H. Tooth (Übersicht in [2]). Mit einer Prävalenz von bis zu 1 : 2.500 in der Bevölkerung ist die CMT eine der häufigsten monogen erblichen Erkrankungen des Menschen [3]. Die Patienten erkranken meist in den ersten beiden Lebensjahrzehnten und zeigen üblicherweise eine Schwäche und Atrophie in den distalen Abschnitten der unteren, im weiteren Krankheitsverlauf auch der oberen Extremitäten, distale, oft socken- und handschuhförmig verteilte sensible Defizite, abgeschwächte oder fehlende Muskeleigenreflexe sowie Fußdeformitäten [4-5]. Bei einzelnen Patienten bzw. in Abhängigkeit von dem genetischen Subtyp können zusätzliche Symptome wie Hirnnervenbeteiligung, respiratorische Insuffizienz, autonome Störungen, Spastik, zerebelläre Ataxie, Optikusatrophie, Glaukom oder Skoliose auftreten (Übersicht in [6]). Die Erkrankung schreitet in der Regel langsam progredient voran und führt im Normalfall nicht zu einer Reduzierung der Lebenserwartung, jedoch regelmäßig zu lebenslanger körperlicher Behinderung und bei einem Teil der Patienten zum Verlust der Gehfähigkeit (Übersicht in [7]). Die Behandlung ist rein symptomatisch (z. B. Physiotherapie, Versorgung mit Orthesen bei ausgeprägter Fußheberschwäche, ggf. operative Korrektur von Fußdeformitäten), eine kausale Therapie ist bisher nicht verfügbar (Übersicht in [7-8]). In Tiermodellen erfolgreiche Behandlungsansätze, z. B. mit Ascorbinsäure bei Mäusen mit Überexpression des *PMP22*-Gens [9], waren in klinischen Studien nicht effektiv [10].

### 2.2 Demyelinisierende und axonale Formen der CMT

Peter J. Dyck und Edward H. Lambert unterschieden 1968 anhand elektrophysiologischer und histopathologischer Kriterien [11-12] erstmals zwei Hauptgruppen der autosomal dominanten CMT. Seitdem wird die Erkrankung in die demyelinisierende CMT1 und die axonale (neuronale) CMT2 eingeteilt. Die CMT1 geht mit deutlich verlangsamten motorischen und sensiblen Ner-

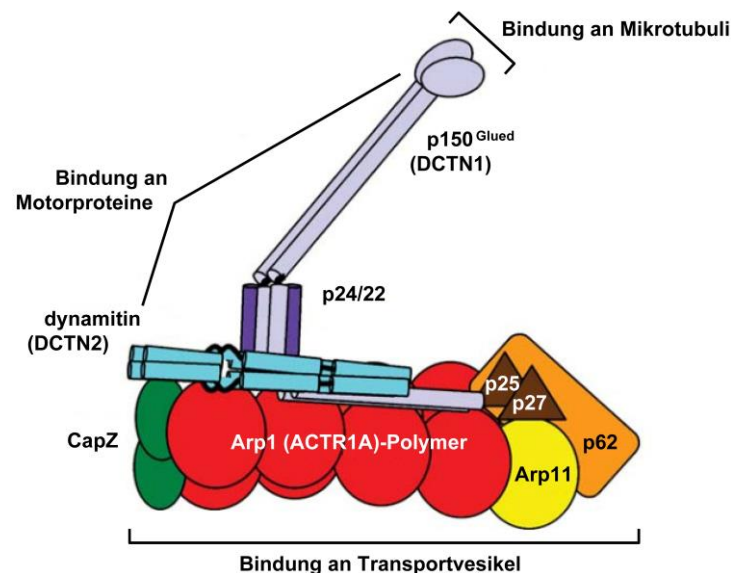
venleitgeschwindigkeiten (NLG) einher (Grenzwerte für die motorische NLG des N. medianus oder N. ulnaris: < 38 m/s). Bei der CMT2 sind die NLG normal oder allenfalls gering verzögert, stattdessen sind die Amplituden der Aktionspotentiale der Muskeln und sensiblen Nerven deutlich reduziert. In Nervenbiopsien [13], für die es heute aufgrund der Fortschritte in der molekulargenetischen Diagnostik (2.3) bei erblichen Neuropathien keine Indikation mehr gibt, finden sich bei der CMT1 im Verhältnis zum Axondurchmesser zu dünn myelinisierte Axone und sogenannte Zwiebschalenformationen, die wiederholte De- und Remyelinisierungsprozesse anzeigen. Bei der CMT2 stehen hingegen der Verlust großkalibriger myelinisierter Fasern und Zeichen der Nervenfaserverregeneration im Vordergrund.

## 2.3 Genetik der CMT

Bei der CMT treten alle beim Menschen bekannten monogenen Vererbungsmuster auf (autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal [14-15] und mitochondrial/maternal [16]). Weltweit sind autosomal dominante Formen am häufigsten anzutreffen, allerdings sind in Regionen und ethnischen Gruppen mit hoher Rate an konsanguinen Verbindungen autosomal rezessive Formen für bis zu 50 % der Erkrankungsfälle verantwortlich [17]. Bisher konnten mehr als 80 Gene identifiziert werden, in denen Mutationen zu verschiedenen Formen der CMT führen können (Übersicht in [18]). Trotzdem gelingt der Nachweis des verantwortlichen Gendefekts nicht bei jedem Patienten. Bei der CMT2 liegt die Mutationsdetektionsrate weiterhin bei lediglich circa 25 %, bei der CMT1 werden hingegen 60 - 80 % erreicht [19-22]. Die häufigste nachweisbare Ursache ist eine heterozygote Duplikation des *PMP22*-Gens (CMT1A), die für bis zu 70 % der CMT1-Fälle verantwortlich ist [23]. Weitere in der molekulargenetischen Routinediagnostik regelmäßig identifizierte Genvarianten bei CMT-Patienten sind *GJB1*-, *MPZ*- und *MFN2*-Mutationen. Bis zu 90 % der Patienten, bei denen der ursächliche Gendefekt nachweisbar ist, tragen Mutationen in diesen vier Genen [19-22]. Einige CMT-assoziierte Gene kodieren für Proteine, deren Bedeutung für das periphere Nervensystem offensichtlich ist (z. B. Bestandteile der Myelinscheide von peripheren Nerven (*PMP22*, *MPZ*) und Neurofilamente (*NEFL*, *NEFH*)). Andere CMT-Gene werden ubiquitär exprimiert und sind an biologischen Prozessen beteiligt, die für viele oder alle Zelltypen, Gewebe und Organe von entscheidender Bedeutung sind (z. B. *gap junctions* (*GJB1*), mitochondriale Dynamik (*GDAP1*, *MFN2*), Rho-GTPase-Signalwege (*FGD4*) und Proteinbiosynthese (*GARS*)) (Übersicht in [24]).

## 2.4 Axonaler Transport, Dynactin und ACTR1A

In Neuronen, insbesondere in jenen mit langen Axonen (z. B. spinale Motoneurone oder sensible Hinterstrangganglienzellen), ist der Mikrotubuli-abhängige schnelle axonale Transport von besonderer Bedeutung, um neu synthetisierte Zellbestandteile in die Peripherie zu bringen (anterograde axonaler Transport) oder um Signalmoleküle aus der Peripherie zum Zellkern zu transportieren (retrograde axonaler Transport) (Übersicht in [25]). Störungen des axonalen Transports sind ein naheliegender und inzwischen auch vielfach bestätigter Pathomechanismus für verschiedene erbliche und erworbene neurologische Krankheitsbilder (Übersicht in [26-27]). Eine wichtige Komponente der Transportmaschinerie in Zellen ist der Multiproteinkomplex Dynactin (*dynein activator*). Dynactin ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert und kommt in nahezu allen Zellen und Geweben des menschlichen Körpers einschließlich des zentralen und peripheren Nervensystems vor ([28], Übersicht in [29]). Dynactin koppelt das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein Dynein an Transportvesikel und andere zu transportierende Zellbestandteile [30-31] und verstärkt außerdem die Bindung des Dynein-Dynactin-Komplexes an Mikrotubuli [32]. Neben der Regulation intrazellulärer Transportprozesse ist Dynactin unter anderem essentiell für die Organisation des Spindelapparates und die Bewegung des Zellkerns während der Mitose [33]. Darüber hinaus ist es für die Bildung von Neuriten während der Differenzierung von Neuronen erforderlich [34-35].



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Dynactin-Komplexes**

Dynactin besteht aus elf verschiedenen Proteinen, die in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen. Unter anderem enthält der Komplex acht ACTR1A-Moleküle. Sie bilden das Rückgrat des Dynactin-Komplexes und binden an Transportvesikel und andere zu transportierende Zellbestandteile. DCTN2 koppelt das ACTR1A-Filament an DCTN1, das mit Motorproteinen und Mikrotubuli interagiert. Abbildung modifiziert nach [29].

Das Dynactin-Makromolekül besteht aus elf verschiedenen Proteinen, die in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen, sodass sich ein Komplex aus 23 Untereinheiten ergibt. Die Basis des Komplexes bilden stabile, 37 nm lange Aktin-ähnliche Filamente [36], die aus acht ACTR1A-Einheiten und je einem  $\beta$ -Akin- und einem Arp11-Molekül aufgebaut sind (**Abb. 1**) [37]. Ein Dynamitin (DCTN2, p50)-Tetramer bildet das Bindeglied zwischen dem ACTR1A-Filament und einem Dimer der größten Untereinheit p150<sup>Glued</sup> (DCTN1) [38]. DCTN1 ist für die Interaktion mit Dynein-Motorproteinen verantwortlich [30], bindet aber auch direkt an Mikrotubuli, wodurch die Interaktion zwischen dem Dynein-Dynactin-Komplex und Mikrotubuli stabilisiert wird [32]. Die Verknüpfung des Komplexes mit Transportvesikeln vermittelt das ACTR1A-Filament, indem es z. B. mit Spektrin auf der Vesikeloberfläche interagiert [31].

Humanes ACTR1A (Synonyme: Actin related protein 1 (Arp1), Centractin alpha) ist ein kleines, aus 376 Aminosäuren bestehendes globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42,6 kDa, das starke Homologie zu Aktin zeigt [39]. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz liegt bei über 50 %, womit ACTR1A das Protein aus der Familie der *actin-related-Proteine* ist, das Aktin am ähnlichsten ist [40]. In Zellen ist ACTR1A diffus im Zytoplasma lokalisiert und akkumuliert im Bereich der Zentrosomen [41]. Beim Menschen wird ACTR1A von dem gleichnamigen, elf Exons umfassenden Gen *ACTR1A* auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q24.32) kodiert.

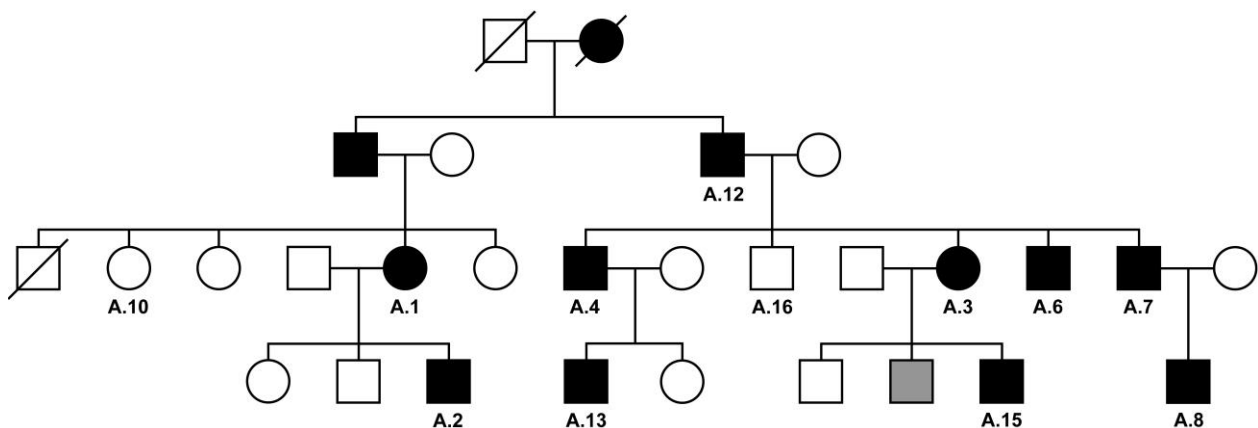
### 3. Ziele der Arbeit

Die CMT gehört zu den häufigsten monogen erblichen Erkrankungen. Sie geht zwar in der Regel mit einer normalen Lebenserwartung einher, führt jedoch zu voranschreitenden körperlichen Einschränkungen, insbesondere der Gehfähigkeit. Es konnten bisher mehr als 80 Gene beschrieben werden, in denen Mutationen als Ursache einer CMT infrage kommen. Dennoch ist bisher lediglich bei etwa der Hälfte der Patienten eine molekulare Diagnose möglich. Der Nachweis der genauen genetischen Ursache ist für die Betroffenen und ihre Familien als Erklärung für die bestehenden Symptome und im Hinblick auf eine gezielte genetische Beratung, Fragen der Familienplanung und die weitere medizinische Betreuung von großer Bedeutung. Die Identifizierung von CMT-Genen bzw. ihrer Genprodukte ermöglicht zudem Einblicke in die Pathophysiologie des peripheren Nervensystems, woraus sich neue Optionen für die Entwicklung gezielter Therapieansätze ergeben können.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war eine molekulargenetisch noch nicht aufgeklärte autosomal dominante CMT-Familie, deren Stammbaum zwölf betroffene Personen in vier Generationen umfasste. Das erste Ziel war deshalb, die krankheitsverursachende Mutation in dieser Familie mittels *whole-exome*-Sequenzierung zu identifizieren und das potentielle neue Krankheitsgen - wenn möglich - durch Nachweis von Mutationen bei weiteren, nicht verwandten CMT-Patienten zu bestätigen. Das zweite Ziel bestand darin, durch molekular- und zellbiologische Untersuchungen pathophysiologische Zusammenhänge zwischen dem nachgewiesenen Gendefekt und der Entstehung einer CMT aufzuzeigen. Die Ergebnisse sollten zu einer effektiven molekulargenetischen Diagnostik, gezielten Prognosestellung und genetischen Beratung von CMT-Patienten beitragen und zugleich die Basis für die weitere Erforschung des zugrunde liegenden Krankheitsmechanismus und die Entwicklung einer kausalen, möglicherweise gen- oder mutationsspezifischen Therapie schaffen.

## 4. Patienten

Im Mittelpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen stand eine deutsche Familie (Familie A) mit ätiologisch unklarer CMT. Über vier Generationen waren zwölf Familienmitglieder von einer in der ersten oder frühen zweiten Lebensdekade beginnenden erblichen sensomotorischen Neuropathie mit typischer Symptomatik (2.1) betroffen. Neurophysiologische Untersuchungen zeigten Befunde einer axonalen Neuropathie im Sinne einer CMT2 (2.2). Der Stammbaum der Familie wies auf einen autosomal dominanten Erbgang hin (Abb. 2). In der Vergangenheit waren in der humangenetischen Routinediagnostik bereits Mutationen in mehreren bekannten CMT2-Genen (*MPZ*, *MFN2*, *GJB1*, *BSCL2*, *NEFL*, *HSPB1*, *HSPB8* und *GARS*) ausgeschlossen worden. Es standen DNA-Proben von zehn erkrankten (A.1, A.2, A.3, A.4, A.6, A.7, A.8, A.12, A.13 und A.15) und zwei nicht betroffenen Familienangehörigen (A.10 und A.16) zur Verfügung. Als nicht betroffen eingeordnete Familienmitglieder hatten das Erkrankungsalter ihrer betroffenen Angehörigen deutlich (> 10 Jahre) überschritten und wiesen einen unauffälligen klinisch-neurologischen und neurophysiologischen Status auf. Bei drei betroffenen Personen (A.1, A.7 und A.12) wurde eine *whole-exome*-Sequenzierung durchgeführt. Bei den übrigen Familienangehörigen wurden anschließend gezielt DNA-Abschnitte, in denen sich in der *whole-exome*-Sequenzierung bei allen drei untersuchten Personen übereinstimmende Auffälligkeiten gezeigt hatten, mit der Sanger-Methode sequenziert.



**Abb. 2: Stammbaum der Familie A**

Der Stammbaum weist auf eine autosomal dominante Vererbung der Erkrankung hin. Quadrate: männlich; Kreise: weiblich; schwarz gefüllte Symbole: Diagnose einer CMT2; grau gefüllte Symbole: klinischer Status unklar, wahrscheinlich betroffen; leere Symbole: klinisch und neurophysiologisch keine Hinweise auf eine Neuropathie; diagonal durchgestrichene Symbole: verstorbene Personen.

---

Für die gezielte Analyse des in der Familie A identifizierten Kandidatengens wurden DNA-Proben von 89 weiteren CMT2-Patienten ausgewählt, die einen ähnlichen Phänotyp wie die Familie A aufwiesen, mit dieser nicht verwandt waren und bislang keine molekulargenetische Diagnose erhalten hatten. Zu den Einschlusskriterien zählten das Vorliegen einer klinisch und neurophysiologisch gesicherten axonalen sensomotorischen Neuropathie, ein Erkrankungsbeginn in der ersten bis dritten Lebensdekade und ein nachweisbarer oder vermuteter autosomal dominanter Erbgang. Die molekulargenetischen Untersuchungen erfolgten mittels Sanger-Sequenzierung aller kodierenden Exons des Kandidatengens.

Die genetischen Untersuchungen wurden an DNA-Proben durchgeführt, die vor Beginn dieser Arbeit zur molekulargenetischen Diagnostik einer CMT gewonnen worden waren. Die Aufklärung und schriftliche Einwilligung der jeweiligen Personen oder - im Fall von Minderjährigen - ihrer Eltern erfolgten gemäß den Vorgaben des Gendiagnostikgesetzes, wobei die Einwilligung die Zustimmung zur Verwendung der Proben für wissenschaftliche Fragestellungen einschloss. Von der Person A.6 stand zudem eine im Rahmen der vorangegangenen Diagnostik gewonnene Hautfibroblastenkultur zur Verfügung. Als Kontrolle diente eine Fibroblastenkultur eines nicht an einer Neuropathie erkrankten, nicht verwandten, anonymisierten Spenders.

## 5. Materialien und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reagenzien von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Experimente wurden mit geringfügigen Modifikationen nach publizierten Protokollen [42-45] oder nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

### 5.1 Molekulargenetische Methoden

#### 5.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Um DNA-Abschnitte analysieren (z. B. mit DNA-Sequenzierung (5.1.3)) oder anderweitig verwenden zu können (z. B. zur Klonierung (5.1.8, 5.1.9)), wurden die Zielsequenzen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt [46]. Die für die PCR benötigten Startfragmente (Primer) wurden aus Publikationen oder Vektorkarten entnommen oder anhand öffentlich zugänglicher Sequenzen (UCSC Genome Browser) mithilfe des Programms Primer3 [47] ausgewählt und von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 10.1 aufgelistet. Für die Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler vom Typ MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, Hercules, USA) verwendet.

#### 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

PCR-Produkte (5.1.1) oder Restriktionsverdauere (5.1.9) wurden mit dem Ladepuffer 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt, auf ein Agarosegel (1 % Agarose und 0,03 µl/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer) aufgetragen und bei 140 V in 1x TAE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Fragmentgrößen wurden mithilfe der Marker GeneRuler 100 bp DNA ladder und GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Falls notwendig, wurden Fragmente der erwarteten Größe aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt. DNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop 1000-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) ermittelt. Die aufgereinigten Fragmente konnten anschließend für die Sequenzierung (5.1.3) oder Klonierung (5.1.8, 5.1.9) verwendet werden.



### 5.1.3 DNA-Sequenzanalyse mit der Sanger-Methode

Für die Sequenzierung wurden durch Gelextraktion gereinigte PCR-Produkte (5 - 20 ng, siehe 5.1.2) und Plasmid-DNA (150 - 300 ng, siehe 5.1.8 und 5.1.9) eingesetzt. Die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode [48] führte die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) als *cycle sequencing* [49] mit dem entsprechenden Primer (20 pmol) und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden [50] durch. Die so gewonnenen Chromatogramme wurden durch Abgleich mit öffentlich zugänglichen Referenzsequenzen des humanen Genoms (UCSC Genome Browser) auf Sequenzvarianten überprüft.

### 5.1.4 DNA-Sequenzanalyse mit *whole-exome*-Sequenzierung

Die *whole-exome*-Sequenzierung ist eine Anwendung der *next-generation-sequencing* (NGS)-Technologien, bei der gleichzeitig alle kodierenden Sequenzen im Genom analysiert werden (Übersicht in [51-52]). Die Sequenzierung der DNA-Proben der Familienmitglieder A.1, A.7 und A.12 wurde durch das Institut für Humangenetik am Helmholtz Zentrum München (Arbeitsgruppe PD Dr. med. Tim M. Strom) durchgeführt. Dazu wurden nach Fragmentierung der DNA alle Exons und unmittelbar angrenzende Intron- und UTR-Abschnitte mit dem SureSelect Human all Exon 50 Mb v4-Array (Agilent, Santa Clara, USA) angereichert und anschließend auf einem HiSeq2000-Sequenzierautomaten (Illumina, San Diego, USA) sequenziert. Die Zuordnung der gewonnenen Sequenzdaten zum humanen Referenzgenom (Version GRCh37/Hg19) erfolgte mit dem Programm BWA (Burrows-Wheeler alignment tool, Version 0.5.8) [53]. Basenaustausche, Deletionen und Insertionen wurden mit dem Programm SAMtools (Version 0.1.7) identifiziert [54]. Hap-Map-Einzelnukleotid-Polymorphismen, die in der dbSNP-Datenbank (Version 135) vorkamen, wurden bei einer mittleren Heterozygotie-Rate von > 0,02 von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Varianten herausgefiltert, die in mehr als zwei von insgesamt über 6.000 in der internen Datenbank des Helmholtz Zentrums vorhandenen *whole-exome*-Datensätzen von Patienten vorkamen, deren Diagnosen keinen Bezug zu der in dieser Studie untersuchten Neuropathie hatten. Schließlich wurde die weitere Auswertung auf nicht-synonyme Varianten (*nonsense*, *frameshift*, *splice*, *missense* und *in-frame-indel*) beschränkt. Zur Beurteilung der Konsequenzen von *missense*-Mutationen wurden neben der Konservierung des betroffenen Aminosäurerests in der Evolution eine Reihe von bioinformatischen Algorithmen (10.4) herangezogen.

### 5.1.5 Segregationsanalyse in der Familie A und *ACTR1A*-Mutationssuche in weiteren CMT2-Familien

Circa 100 bp lange DNA-Abschnitte, die in der *whole-exome*-Sequenzierung nachgewiesene Varianten enthielten, sowie Exons und unmittelbar angrenzende intronische Sequenzen des *ACTR1A*-Gens wurden mittels PCR amplifiziert (siehe **10.1** für Primer-Sequenzen). Ein Reaktionsansatz beinhaltete üblicherweise 25 µl des Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 25 - 50 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA, jeweils 100 pmol des Forward- bzw. Reverse-Primers und 22 µl nukleasefreies Wasser. Ein typisches PCR-Programm zeigt **Tab. 1**. PCR-Produkte wurden durch Gelextraktion gereinigt (**5.1.2**) und anschließend nach der Sanger-Methode sequenziert (**5.1.3**).

**Tab. 1: PCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Zyklen	Reaktionsschritt
95 °C	2,0 min	1	Denaturierung der DNA
95 °C	0,5 min	35	Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge
60 °C	0,5 min		Anlagerung der Primer
72 °C	1,0 min		Synthese des DNA-Doppelstrangs
72 °C	7,0 min	1	Abschließende Extension

### 5.1.6 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Amplifikation der Leserahmen von *ACTR1A* und *DCTN2*

Um den Leserahmen von *ACTR1A* (RefSeq: NM\_005736.3, NP\_005727.1) und *DCTN2* (RefSeq: NM\_006400.4, NP\_006391.1) für die Klonierung von Expressionskonstrukten zu erhalten, wurde zunächst mRNA aus HEK293-Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen in 1,5 ml Trizol aufgenommen, auf- und abpipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Auftrennung von Proteinen, DNA und RNA wurden die Proben mit 0,3 ml Chloroform versetzt, 15 s geschüttelt und nach 2 min Ruhephase bei Raumtemperatur für 15 min bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige obere Phase abgenommen und mit einer äquivalenten Menge Isopropanol versetzt. Die RNA wurde dann mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Nach Kontrolle von Konzentration und Reinheit mit einem NanoDrop 1000-Spektralphotometer wurde 1 µg der gewonnenen RNA mit dem Reverse Transkriptase iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad) in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsprotokoll ist in **Tab. 2** dargestellt.

**Tab. 2: Reverse Transkription zur cDNA-Synthese**

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt
25 °C	5 min	Anlagerung der Primer
42 °C	30 min	Synthese des cDNA-Gegenstrangs
85 °C	5 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Ausgehend von der cDNA wurden mithilfe spezifischer *ACTRIA*- bzw. *DCTN2*-Klonierungsprimer (10.1), die zusätzlich am 5'-Ende mit Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung (5.1.9) versehen waren, die Zielsequenzen amplifiziert. Dazu wurde das AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit dem in Tab. 3 und Tab. 4 dargestellten Reaktionsansatz bzw. Reaktionsprotokoll verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Gelextraktion (5.1.2) aufgereinigt.

**Tab. 3: Reaktionsansatz zur Amplifikation des *ACTRIA*- und *DCTN2*-Leserahmens**

Komponente	Volumen/Menge
10x AccuPrime Pfx Reaktionsmix	5 µl
Klonierungsprimer	jeweils 100 pmol
cDNA	1-2 µl (je nach Konzentration)
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	0,4 µl
Nukleasefreies Wasser	auf 50 µl auffüllen

**Tab. 4: PCR-Programm zur Amplifikation des *ACTRIA*- und *DCTN2*-Leserahmens**

Temperatur	Zeit	Zyklen	Reaktionsschritt
95 °C	2,0 min	1	Denaturierung der DNA
95 °C	0,5 min	35	Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge
60 °C	0,5 min		Anlagerung der Primer
72 °C	1,0 min		Synthese des DNA-Doppelstrangs
72 °C	5,0 min	1	Abschließende Extension

### 5.1.7 Einfügen der Mutation p.N133D durch *overlap-extension*-PCR

Zur Generierung eines *ACTRIA*-Leserahmens mit der Mutation p.N133D wurden zwei komplementäre *ACTRIA*-Mutageneseprimer verwendet, die die mutierte Sequenz enthielten (10.1). Durch Kombination jeweils eines Mutageneseprimers und eines flankierenden *ACTRIA*-

Klonierungsprimers (10.1) wurden mit dem AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System an der *ACTRIA*-cDNA zwei Fragmente amplifiziert, die sich im Bereich der Mutation überlappten [55]. Anschließend wurden jeweils 200 ng der beiden durch Gelextraktion (5.1.2) gereinigten PCR-Produkte mit den flankierenden Klonierungsprimern in einer dritten PCR eingesetzt, um den *ACTRIA*-Leserahmen mit der p.N133D-Variante zu amplifizieren. Dazu wurde wieder das AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System verwendet. Die PCR-Produkte wurden durch Gelextraktion (5.1.2) gereinigt und zur Klonierung in TOPO-TA-Vektoren (5.1.8) verwendet.

### 5.1.8 Klonierung von PCR-Fragmenten in TOPO-TA-Vektoren

Die der Wildtyp- und mutierten *ACTRIA*-cDNA bzw. der *DCTN2*-cDNA entsprechenden PCR-Produkte (5.1.6, 5.1.7) wurden durch Inkubation (30 min bei 72 °C) mit einer Taq-Polymerase (Maxima Hot Start Green PCR Master Mix) an den 3'-Enden mit einem Desoxyadenosin-Überhang versehen. Daraufhin erfolgte die Klonierung der Fragmente (200 ng (*ACTRIA*) bzw. 250 ng (*DCTN2*)) in den TOPO-TA-Vektor mithilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen). Die Plasmide wurden anschließend in Bakterien transformiert (5.1.10) und auf Agarplatten ausgebracht (5.1.11). Aus Klonen, die in der Blau-Weiß-Selektion und der Kolonie-PCR positive Ergebnisse zeigten, wurde Plasmid-DNA isoliert (5.1.11), die zum Ausschluss von PCR- oder Klonierungsartefakten mit M13-Universalprimern (10.1) sequenziert wurde (5.1.3).

### 5.1.9 Restriktionsverdau und Ligation in pCMV-Vektoren

Nach Bestätigung einer fehlerfreien Klonierung wurden die *ACTRIA*- bzw. *DCTN2*-Inserts mit Restriktionsenzymen unter Verwendung der mittels PCR eingefügten Schnittstellen (5.1.6, 5.1.7) aus den TOPO-TA-Vektoren herausgeschnitten und anschließend mit gleichartig verdauten pCMV-Expressionsvektoren ligiert. Für *ACTRIA* wurden *EcoRI* und *KpnI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) und der Vektor pCMV-Myc-N (Clontech, Mountain View, USA) und für *DCTN2* *EcoRI* und *XhoI* (New England Biolabs) und der Vektor pCMV-HA-N (Clontech) verwendet. Für die Restriktionsverdau wurde der in **Tab. 5** dargestellte Reaktionsansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die jeweiligen Inserts und Expressionsvektoren durch Gelextraktion gereinigt (5.1.2) und mithilfe einer T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) ligiert. Für den Reaktionsansatz wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 1 : 5 (*ACTRIA*-Wildtyp und *DCTN2*) bzw. 1 : 2 (*ACTRIA*-Mutante) eingesetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und die Ligase im Anschluss durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Die hergestellten Konstrukte wurden in Bakterien transformiert (5.1.10), die auf Agarplat-

ten ausgebracht wurden (**5.1.11**). Aus Klonen, die in der Blau-Weiß-Selektion und der Kolonie-PCR positive Ergebnisse zeigten, wurde Plasmid-DNA isoliert (**5.1.11**), die zum Ausschluss von Klonierungsartefakten mit pCMV-Sequenzierprimern (**10.1**) sequenziert wurde (**5.1.3**).

**Tab. 5: Restriktionsverdau**

Komponente	Volumen/Menge
DNA	5 µg (pCMV) - 15 µg (TOPO-TA)
10x CutSmart-Puffer	5 µl
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	2,5 µl
Restriktionsenzym <i>KpnI</i> (DCTN2: <i>XhoI</i> )	5 µl (2,5 µl)
Nukleasefreies Wasser	auf 50 µl auffüllen

### 5.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für die Transformation wurden die *E.coli*-Stämme DH5α, TOP10 (OneShot TOP10 Chemically competent cells, Invitrogen) und K802 verwendet. Jeweils 25 µl der Bakteriensuspension wurden mit 2 µl des Ligationsproduktes (**5.1.8**, **5.1.9**) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurde das Gemisch 2 min auf Eis stehen gelassen und dann mit 0,2 ml S.O.C.-Medium (New England Biolabs) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend für die Bakterienkultur (**5.1.11**) verwendet.

### 5.1.11 Bakterienkultur

Jeweils 100 µl der Transformationsansätze (**5.1.10**) wurden auf LB-Agarplatten (1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 15 g Bacto-Agar) ausplattiert. Der Agar enthielt je nach Antibiotika-Resistenzgen des verwendeten Vektors Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml). Zur Unterscheidung zwischen Kolonien mit aufgenommenem Insert und solchen, die kein Insert aufwiesen, erfolgte eine Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal. Weiße Kolonien, bei denen von der erfolgreichen Ligation des Inserts ausgegangen wurde, wurden zusätzlich mit einer Kolonie-PCR untersucht. Dazu wurde ein Teil der Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und in einem PCR-Ansatz (Maxima Hot Start Green PCR Master Mix) gelöst. Die PCR zum Nachweis des Transgens erfolgte mit *ACTRIA*- bzw. *DCTN2*-Klonierungsprimern (**10.1**); anschließend wurde mittels Gelelektrophorese (**5.1.2**) überprüft, ob Banden mit der erwarteten Größe nachweisbar waren. Die Reaktionsschritte sind in **Tab. 6** dargestellt.

**Tab. 6: Programm einer Kolonie-PCR**

Temperatur	Zeit	Zyklen	Reaktionsschritt
95 °C	6,0 min	1	Denaturierung der DNA
95 °C	0,5 min	25	Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge
60 °C	0,5 min		Anlagerung der Primer
72 °C	1,0 min		Synthese des DNA-Doppelstrangs
72 °C	5,0 min	1	Abschließende Extension

Kolonien mit positivem Ergebnis in der PCR dienten der Animpfung von Flüssigkulturen aus LB-Medium (1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt), die über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Je nach verwendetem Plasmid wurde den Kulturen Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben. Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem QIAprep8-System (Qiagen) oder dem NucleoBond PC 500-Kit (Macherey-Nagel).

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Kultivierung der Zellen

Für die Experimente wurden die Säugerzelllinien HEK293 (embryonale Nierenzellen (Mensch)), HeLa (Ursprung Zervixkarzinom (Mensch)), Cos7 (Ursprung Nierenepithel (Affe)), NIH3T3 (embryonale Fibroblasten (Maus)) und Neuro-2a (Ursprung Neuroblastom (Maus)) verwendet. Alle Zelllinien wurden über ATCC (LGC Standards, Wesel, Deutschland) bezogen. Darüber hinaus standen Hautfibroblasten von einem Patienten der Familie A (A.6) und einer nicht an einer Neuropathie erkrankten Kontrollperson zur Verfügung. Die Zellen wurden bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % adhärent wachsend in DMEM (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) mit 10 % FCS (Thermo Fisher Scientific), 2 % L-Glutamin (GE Healthcare) und 0,4 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte in der Regel bei einer Dichte von 70 - 80 %. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, durch Behandlung mit Trypsin-EDTA von der Kulturschale gelöst und anschließend in frischem Kulturmedium verdünnt ausgesät.

### 5.2.2 Transiente Transfektionen

Die Transfektion der Zellen erfolgte bei einer Dichte von 50 - 70 % mithilfe des Transfektionsreagenzes jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich), das auf dem kationischen Polymer

Polyethylenimin basiert [56]. Es wurden jeweils 8 µg des entsprechenden Expressionskonstrukts für Westernblots bzw. 2 µg für Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. Für Westernblots wurden die Zellen zusätzlich mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) co-transfiziert, um später die Transfektionseffizienz durch Messung der GFP-Spiegel abschätzen zu können.

### **5.2.3 Differenzierung von Neuro-2a-Zellen**

Um Neuro-2a-Zellen zur Differenzierung anzuregen (erkennbar an der Bildung von neuritenähnlichen Zellausläufern [57]), wurden die Zellen statt in Wachstumsmedium in einem serumfreien Differenzierungsmedium kultiviert [58]. Abweichend von dem ansonsten unveränderten Transfektionsprotokoll (5.2.2) wurden Neuro-2a-Zellen bei einer Konfluenz von 40 - 50 % mit 1 µg des Plasmids transfiziert. Nach 4 h wurde die Transfektionsmischung durch Differenzierungsmedium (DMEM, 2 % L-Glutamin, 0,2 % Normocin (InvivoGen, San Diego, USA)) ersetzt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Im Anschluß erfolgte die Fixierung der Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen (5.4).

## **5.3 Proteinchemische Methoden**

### **5.3.1 Herstellung von Proteinextrakten**

Um aus Zellkulturen Material für Westernblot oder Co-Immunpräzipitation zu gewinnen, wurden die Zellen mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst, in 1 ml 1x PBS aufgenommen und zentrifugiert (4 °C, 10 min, 14.000 rpm). Anschließend wurden 100 - 400 µl eines Lyse-Puffers (1 % SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)) zugegeben und die Zellen nach zehnminütiger Inkubation auf Eis durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation konnte der proteinhaltige Überstand für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden. Proteinkonzentrationen wurden mit einem NanoDrop 1000-Spektralphotometer ermittelt.

### **5.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot**

Um die Menge bestimmter Proteine in Zellen (5.3.1) oder Immunpräzipitaten (5.3.3) bestimmen zu können, wurden die Proteingemische durch eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt [59], auf eine Membran übertragen und immunologisch nachgewiesen (Westernblot). Dazu wurden die Zelllysate mit 6x SDS-Ladepuffer (0,06 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,012 % Bromphenolblau, 9,3 % DTT, 10 % SDS, 30 % Glycerol) versetzt und bei 98 °C für 10 min dena-

turiert. Anschließend wurde ein Polyacrylamid-Gel (4 - 15 % Gradientengel, Biorad) mit den Ly-saten und dem Größenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) beladen. Die Proben wurden zunächst bei 80 V, dann bei 120 V in Laufpuffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt. Die Übertragung (Blot) auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Protran 0.45 NC, GE Healthcare) erfolgte in Transferpuffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 25 % Methanol) in einer Trans-Blot Cell-Apparatur (Biorad) für 2 h bei 110 V und 4 °C. Um die Effizienz des Blots und die Lademenge der Proteine abzuschätzen, wurde die Membran 1 min mit Ponceau S angefärbt und im Anschluss durch zwanzigminütiges Waschen mit 1x TBS-T (1 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,8 % NaCl, 0,1 % Tween 20 (Thermo Fisher Scientific)) entfärbt. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in eine Blockierlösung gelegt, deren Zusammensetzung je nach verwendetem Primärantikörper variierte (3 % BSA in 1x PBS für anti-GFP, 5 % BSA in 1x TBS-T für anti- $\alpha$ -Tubulin bzw. 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T für anti-c-Myc, anti-Arp1 $\alpha$ /Centractin und anti-HA; weitere Informationen zu den verwendeten Antikörpern siehe **10.2**). Die Membran wurde anschließend mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Blockierlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit 1x PBS bzw. 1x TBS-T wurde die Membran in der zugehörigen Blockierlösung mit einem passenden Sekundärantikörper (*horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelte anti-IgG-Antikörper (**10.2**)) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut wie beschrieben gewaschen. Proteinbanden wurden mithilfe des Chemilumineszenz-Detektionsreagenzes ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) auf einem ECL Imager-System (Intas, Göttingen) mit der Aufnahmesoftware ChemoStar sichtbar gemacht. Die so entstandenen Bilder wurden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) densitometrisch ausgewertet.

### 5.3.3 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation ist ein Verfahren, um Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen. Das Prinzip beruht darauf, ein bestimmtes Protein aus einem Protein-Gemisch mithilfe eines spezifischen Antikörpers auszufällen, wobei weitere Proteine, die mit dem ersten Protein verbunden sind, ebenfalls präzipitiert werden. Um festzustellen, ob es zwischen Wildtyp- und mutiertem ACTR1A einen Unterschied in der Affinität zu dem bekannten Bindungspartner DCTN2 gibt, wurden Cos7-Zellen mit ACTR1A (Myc-Tag)- und DCTN2 (HA-Tag)-Expressionskonstrukten co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in einem Lyse-Puffer (1x PBS, 5 mM EDTA, 0,5 % NP-40) mit 0,1 mM PMSF und Complete Protease Inhibitor (Roche,



Rotkreuz, Schweiz) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot für die Expressionskontrolle mit SDS-PAGE und Westernblot (5.3.2) abgenommen und der restliche Überstand über Nacht auf einer rotierenden Apparatur mit 25 µl c-Myc Monoclonal Antibody-Agarose Beads (Clontech) inkubiert. Die Beads wurden durch Zentrifugation gewonnen, fünfmal für jeweils 2 min mit 1 ml 1x PBS gewaschen und in 25 µl 6x SDS-Ladepuffer gelöst. Nach 5 min Erhitzen auf 98 °C wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (5.3.2). Abweichend von dem Westernblot-Protokoll wurde anstelle einer Nitrocellulose-Transfer-Membran eine PVDF-Transfer-Membran (Amersham Hybond-P, GE Healthcare) verwendet.

## 5.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) ausgesät, nach 24 h transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Die Zellen wurden dann mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 3,7 % PFA in 1x PBS fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen 15 min in 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation in 5 % Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific) in 1x PBS blockiert. Dann wurden die Deckgläschen über Nacht bei 4 °C mit der entsprechenden Primärantikörperlösung (Primärantikörper (10.2) und 5 % Pferdeserum in 1x PBS) überschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen für 1 h in der Sekundärantikörperlösung (Alexa Fluor-gekoppelte anti-IgG-Antikörper (10.2) und 5 % Pferdeserum in 1x PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten nochmals drei Waschschriffe mit 1x PBS und anschließend die Färbung der Zellkerne mit DAPI. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Deckgläschen in Fluorescence Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingebettet. Für die Mikroskopie und die Aufnahme der Bilder wurden ein Leica DMRBE-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland), eine ORCA 03G-Digitalkamera (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan) und das Programm AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

## 5.5 Auswertung der Immunfluoreszenz-Bilder von Neuro-2a-Zellen

Die Immunfluoreszenz-Bilder der Neuro-2a-Zellen wurden mithilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Neben der Erfassung der Anzahl von Fortsätzen einer Zelle und der Beurteilung ihrer Komplexität (Grad der Verzweigungen) wurde die Länge des jeweils längsten Zellausläufers be-

stimmt. Die Messung erfolgte durch Ziehen einer Freihandlinie und automatische Bestimmung ihrer Länge durch das Programm. Als Fortsatz wurden Strukturen definiert, die eine Länge von mindestens dem 1,5-fachen Querdurchmesser des Zellkörpers aufwiesen. Die Auswertung und Erstellung der zugehörigen Diagramme erfolgte mithilfe der Software MATLAB (Version R2015b; The MathWorks., Natick, USA). Um zu berücksichtigen, dass Zellen mit größeren Zellkörpern in der Regel auch längere Fortsätze bilden können, wurde die Fortsatzlänge relativ zum Querdurchmesser des Zellkörpers angegeben.

## 5.6 *In silico*-Charakterisierung der ACTR1A p.N133D-Variante

Bioinformatische Vorhersagen zur Pathogenität der ACTR1A p.N133D-Variante erfolgten mit den Algorithmen PolyPhen-2 [60], MutationTaster2 [61], PROVEAN [62], SIFT [63], M-CAP [64], CADD [65], FATHMM [66], LRT [67], MutationAssessor [68] und PMut [69]. Zur Abschätzung der evolutionären Konservierung der Position N133 im humanen ACTR1A-Protein wurden die Algorithmen PhyloP, PhastCons [70] und GERP++ [71] eingesetzt. Mithilfe des Programms CLUSTALW [72] wurde mit Proteinsequenzen von ACTR1A-Orthologen aus verschiedenen Spezies ein *multiple sequence alignment* für eine partielle Sequenz des ACTR1A-Proteins erstellt, die die Position N133 enthielt.

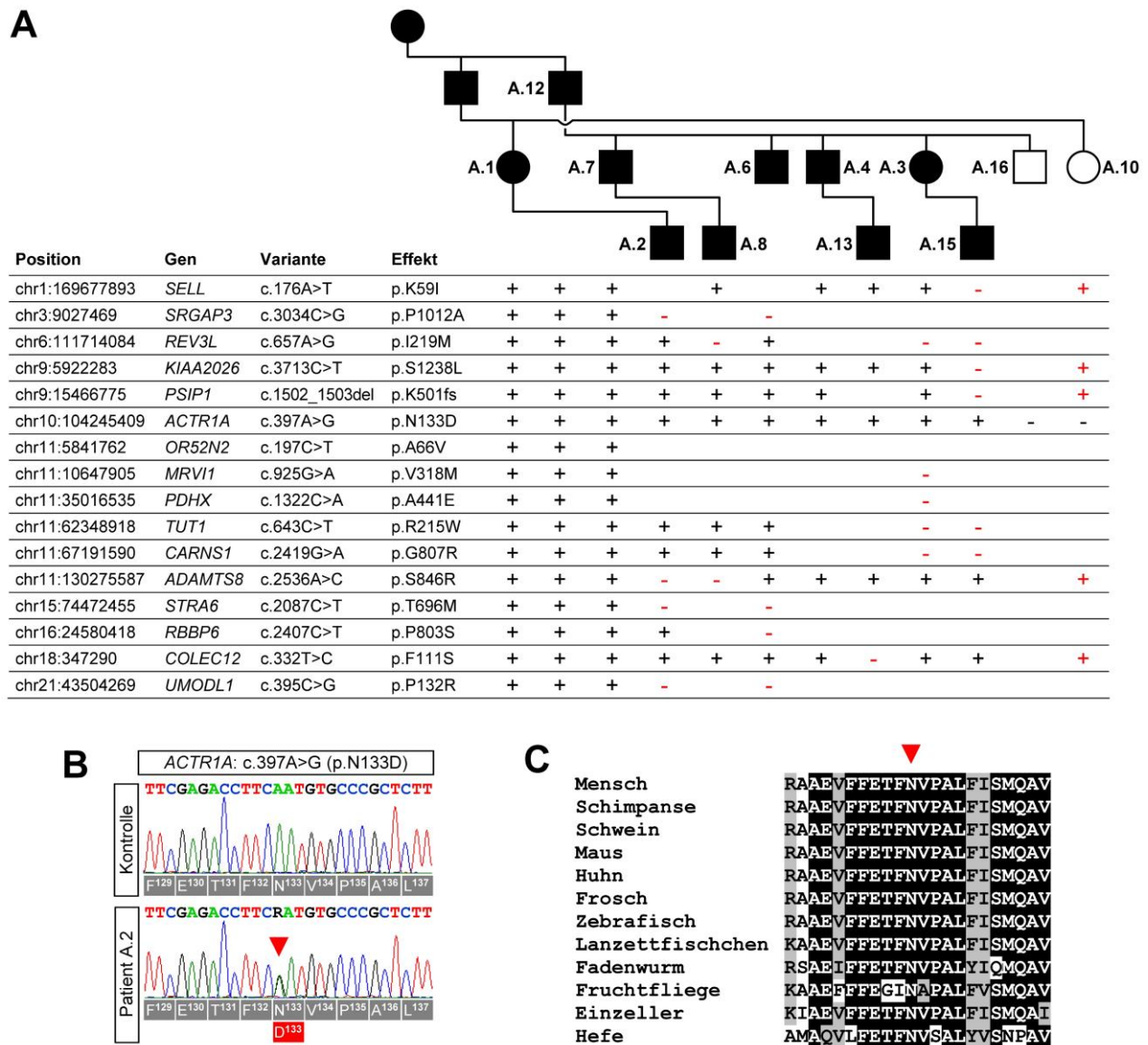
## 6. Ergebnisse

### 6.1 Identifizierung der wahrscheinlich krankheitsverursachenden Mutation

#### 6.1.1 Identifizierung und Eingrenzung von Kandidatengen

In der Familie A konnten bereits im Vorfeld dieser Arbeit Mutationen in einigen bekannten CMT2-Genen ausgeschlossen werden. Da der Stammbaum erkrankte Personen in vier Generationen zeigte und DNA-Proben von mehreren Angehörigen verfügbar waren, erschien die Familie gut geeignet, um eine bislang unbekannte Genmutation und ein neues Neuropathie-Gen zu identifizieren. Dazu wurde das Verfahren der *whole-exome*-Sequenzierung eingesetzt, mit dem nahezu die komplette kodierende Sequenz des menschlichen Genoms ausgelesen werden kann. Eine Herausforderung bei dem Einsatz eines solchen Übersichtsverfahrens zur Identifizierung eines Krankheitsgens für eine monogene Erkrankung ist naturgemäß die Erkennung der relevanten Mutation unter Tausenden von Varianten, die zumeist funktionell bedeutungslos sind oder zur normalen genetischen Variabilität des Menschen beitragen. Eine gängige Strategie beinhaltet den Ausschluss von Varianten, deren Frequenz in der Bevölkerung (näherungsweise repräsentiert durch dbSNP, ExAc [73], EVS [74], 1000Genomes [75]) für eine Assoziation mit einer seltenen monogenen Erkrankung unerwartet hoch ist. Außerdem kann die Analyse auf nicht-synonyme Varianten mit offensichtlichen Folgen für die Proteinsequenz und -funktion beschränkt werden. Nach derartiger Filterung enthält ein an humaner DNA gewonnener Datensatz typischerweise 100 - 200 Varianten. Um die infrage kommenden Varianten weiter einzugrenzen, können - je nach Familienkonstellation - die Gesetzmäßigkeiten der Mendelschen Vererbung genutzt werden. Entsprechend werden für die weitere Auswertung beispielsweise nur Varianten berücksichtigt, die bei mehreren erkrankten Personen in einer Familie gleichzeitig nachweisbar sind und unter denen sich demzufolge auch die relevante Mutation befindet [51-52].

Nach der *whole-exome*-Sequenzierung von drei betroffenen Personen aus der Familie A (A.1, A.7 und A.12) und Filterung auf seltene, nicht-synonyme Varianten verblieben noch 151 (A.1), 138 (A.7) bzw. 147 (A.12) Varianten, von denen 16 bei den drei Patienten gleichzeitig vorhanden waren (**Abb. 3, 10.3**). Alle 16 Varianten betrafen Gene, die zuvor noch nicht mit einer erblichen Neuropathie in Verbindung gebracht worden waren. Die Ergebnisse der *whole-exome*-Sequenzierung bestätigten somit, dass in der Familie A sehr wahrscheinlich eine weitere, bislang unbekannte Form der CMT2 vorliegt.



**Abb. 3: Identifizierung einer *ACTR1A*-Variante in einer CMT2-Familie**

### (A) Segregation von Varianten aus der *whole-exome*-Sequenzierung

Das Vorliegen von 16 Varianten, die bei A.1, A.7 und A.12 mit *whole-exome*-Sequenzierung identifiziert worden waren, wurde bei weiteren Mitgliedern der Familie A mit Sanger-Sequenzierung überprüft. + = Variante nachgewiesen; - = Variante nicht nachweisbar; rotes Symbol = Widerspruch zwischen Genotyp und Phänotyp und damit Ausschluss der Variante bzw. des Kandidatengens.

### (B) Sanger-Sequenzierung zum Nachweis der *ACTR1A*-Variante

Chromatogramme einer partiellen Exon 5-Sequenz einer Patientenprobe (A.2) und einer nicht betroffenen Kontrollperson. Die Position der heterozygoten Variante ist durch einen roten Pfeilkopf gekennzeichnet.

### (C) *Multiple-sequence-alignment* von ACTR1A-Orthologen

Die Position N133 (roter Pfeilkopf) ist in unterschiedlichen Spezies hoch konserviert. Mensch (*homo sapiens*): NP\_005727.1; Schimpanse (*pan troglodytes*): XP\_024202339.1; Schwein (*sus scrofa*): XP\_001928912.1; Maus (*mus musculus*): NP\_058556.1; Huhn (*gallus gallus*): NP\_001007949.1; Frosch (*xenopus laevis*): NP\_001086482.1; Zebrafisch (*danio rerio*): NP\_998537.1; Lanzettfischchen (*branchiostoma floridae*): EEN64168.1; Fadenwurm (*caenorhabditis elegans*): NP\_497108.2; Fruchtfliege (*drosophila melanogaster*): NP\_524331.2; Einzeller (*plasmidium falciparum*): XP\_001350970.1; Hefe (*saccharomyces cerevisiae*): AJV29867.1.

Im nächsten Schritt wurde das Auftreten der 16 verbliebenen Varianten in weiteren DNA-Proben der Familie mit Sanger-Sequenzierung überprüft (**Abb. 3**). Mit Ausnahme von Varianten in *ACTR1A*, *OR52N2*, *MRVII*, *PDHX* und *RBBP6* konnten alle Kandidatengene durch fehlenden Nachweis der Segregation mit der Erkrankung bei mindestens zwei Familienmitgliedern ausgeschlossen werden. Für *MRVII*, *PDHX* und *RBBP6* zeigte sich bei jeweils einem betroffenen Probanden ein Widerspruch zwischen Genotyp und Phänotyp. Außerdem erschien angesichts der vermuteten Funktion von *MRVII* und *RBBP6* bei der Entstehung von Tumoren [76-77] ein Zusammenhang mit dem Auftreten einer Neuropathie eher unwahrscheinlich. *OR52N2* wurde aufgrund der Funktion seines Genprodukts als Geruchsrezeptor und der großen Sequenz-Variabilität von Geruchsrezeptor-Genen (Übersicht in [78]) ausgeschlossen. Somit verblieb *ACTR1A* auf Chromosom 10q24.32 als einziges Kandidatengen (**Abb. 3**). Die Variante in Exon 5 des *ACTR1A*-Gens war ein heterozygoter Austausch von Adenin (A) zu Guanin (G) an Position 397 der kodierenden Sequenz (c.397A>G), der im ACTR1A-Protein an Position 133 zu einem Austausch von Asparagin (N) zu Asparaginsäure (D) führte (p.N133D). Dieser Austausch betraf einen in der Evolution konservierten Aminosäurerest (**Abb. 3**) und wurde von bioinformatischen *in silico*-Vorhersageprogrammen einheitlich als pathogen klassifiziert (**10.4**).

### 6.1.2 Sequenzierung des *ACTR1A*-Gens bei weiteren CMT2-Patienten

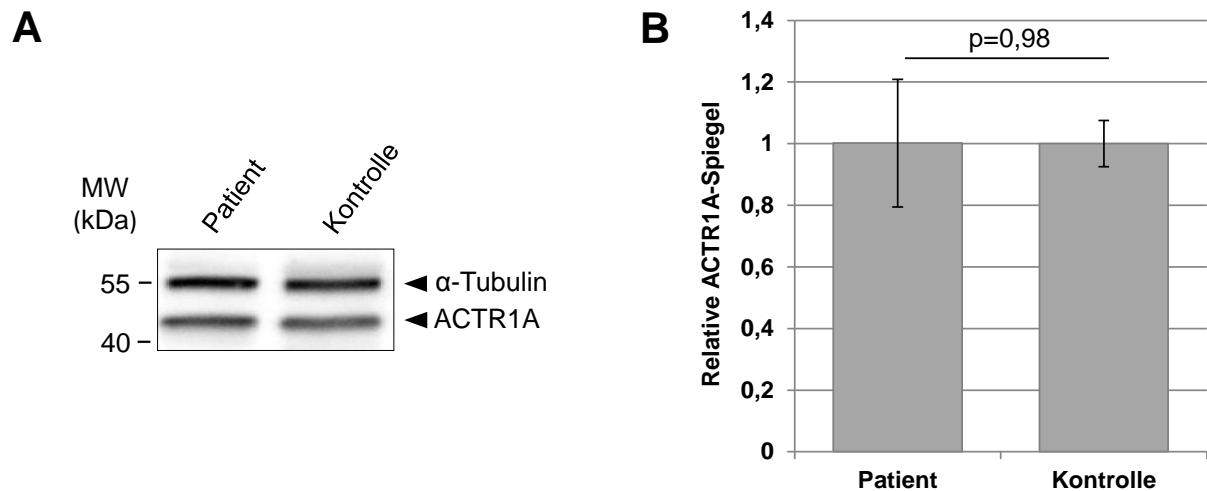
Nach der Eingrenzung möglicher Kandidatengene auf *ACTR1A* wurden DNA-Proben von 89 weiteren, molekulargenetisch ungeklärten CMT2-Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp wie in der initial analysierten Familie A auf *ACTR1A*-Varianten untersucht. Dabei wurden alle elf Exons des *ACTR1A*-Gens sequenziert und durch Vergleich mit der Referenzsequenz ausgewertet. Bei keinem der weiteren Fälle konnte eine als sicher oder wahrscheinlich pathogen anzusehende Mutation nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß fanden sich mehrere Varianten, die aufgrund ihrer Häufigkeit in Datenbanken und ihrer Eigenschaften (fast ausschließlich intronische und synonyme Varianten) als sehr wahrscheinlich harmlos gewertet wurden.

## 6.2 Charakterisierung der *ACTR1A*-Variante c.397A>G (p.N133D)

### 6.2.1 Einfluss der Mutation auf die Menge des ACTR1A-Proteins in Zellen

Um zu untersuchen, ob die p.N133D-Variante einen Effekt auf die ACTR1A-Spiegel in Zellen hat, wurden zunächst Proteinextrakte aus Hautfibroblasten verwendet, die von einem erkrankten Familienmitglied (A.6) und von einem nicht an einer Neuropathie erkrankten anonymisierten

Spender stammten. Ein Westernblot mit einem anti-ACTR1A-Antikörper wies bei Patienten- und Kontrollfibroblasten spezifische Banden vergleichbarer Intensität im Größenbereich von circa 40 kDa nach, was der bekannten molekularen Masse von ACTR1A [39] näherungsweise entsprach. Die densitometrische Auswertung und statistische Testung (ungepaarter zweiseitiger t-Test [79]) zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den ACTR1A-Spiegeln in Patienten- und Kontrollfibroblasten gibt (**Abb. 4**).



**Abb. 4: ACTR1A-Proteinmengen in primären Fibroblasten**

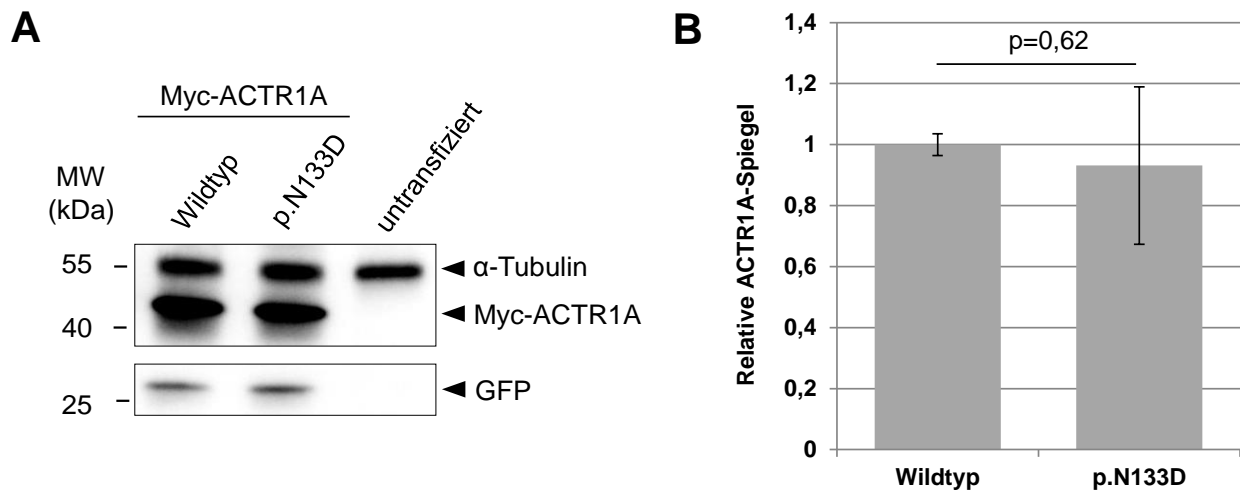
**(A) Repräsentativer Westernblot**

Patienten- und Kontrollfibroblasten zeigten Proteinbanden für ACTR1A im erwarteten Größenbereich und mit ähnlicher Signalstärke.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. MW = Molekulargewicht.

**(B) Quantifizierung der ACTR1A-Spiegel**

Relative Mengen von ACTR1A in Patienten- und Kontrollfibroblasten. Die Intensität der ACTR1A-Banden wurde auf die  $\alpha$ -Tubulin-Spiegel normalisiert. Die ACTR1A-Menge in Patientenfibroblasten wurde auf diejenige der Kontrollzellen bezogen ( $n = 5$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). Die statistische Auswertung (ungepaarter zweiseitiger t-Test) zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Da das mutierte *ACTR1A*-Allel in Patientenfibroblasten heterozygot vorlag, war es denkbar, dass ein kleiner Effekt der Mutation auf die ACTR1A-Menge durch das gleichzeitig vorhandene, von dem anderen Allel kodierte Wildtyp-ACTR1A überlagert wurde. Deshalb wurden Cos7-Zellen mit einem Expressionskonstrukt für Myc-getagtes Wildtyp-ACTR1A oder die p.N133D-Mutante transfiziert und die Proteinspiegel mithilfe eines anti-Myc-Antikörpers im Westernblot bestimmt. Auch für Myc-getagtes ACTR1A wurde eine spezifische Bande mit ähnlicher Signalstärke im erwarteten Größenbereich detektiert. Die densitometrische Auswertung und statistische Testung (ungepaarter zweiseitiger t-Test) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und mutiertem Myc-getagtem ACTR1A (**Abb. 5**).



**Abb. 5: Myc-ACTR1A-Proteinmengen in transfizierten Zellen**

**(A) Repräsentativer Westernblot**

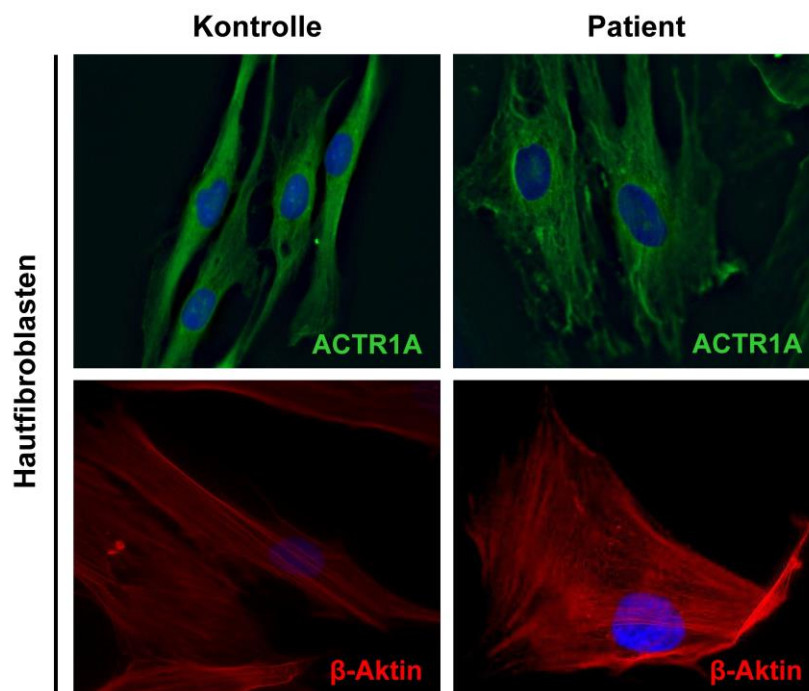
Cos7-Zellen wurden mit Wildtyp- oder mutiertem ACTR1A und einem pEGFP-N1-Leervektor co-transfiziert. Proteinbanden für Myc-getagtes ACTR1A waren im erwarteten Größenbereich und mit ähnlicher Signalstärke nachweisbar. Der Nachweis von GFP ermöglichte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz und  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. MW = Molekulargewicht.

**(B) Quantifizierung der Spiegel von Myc-getagtem ACTR1A**

Relative Mengen von Wildtyp- und p.N133D-mutiertem Myc-getagtem ACTR1A. Die Intensität der ACTR1A-Banden wurde auf die  $\alpha$ -Tubulin- und GFP-Signale normalisiert. Die Menge an mutiertem ACTR1A wurde relativ zur Menge an Wildtyp-ACTR1A dargestellt ( $n = 4$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). Die statistische Auswertung (ungepaarter zweiseitiger t-Test) zeigte keinen signifikanten Unterschied.

## 6.2.2 Lokalisation der ACTR1A p.N133D-Mutante in Zellen

Neben dem Einfluss auf die ACTR1A-Proteinmenge wurde untersucht, ob die ACTR1A p.N133D-Mutante eine Veränderung der Lokalisation des Proteins in der Zelle zur Folge hat. In einem ersten Versuchsansatz wurde endogenes ACTR1A-Protein in Hautfibroblasten eines erkrankten Familienmitglieds (A.6) und einer nicht betroffenen Kontrollperson mithilfe des anti-ACTR1A-Antikörpers in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Die Lokalisation von ACTR1A zeigte zwischen Patienten- und Kontrollfibroblasten keinen eindeutigen Unterschied und entsprach dem für das Wildtyp-Protein erwarteten diffusen zytoplasmatischen Verteilungsmuster [41]. Patienten- und Kontrollzellen unterschieden sich jedoch in ihrer äußeren Form: Die Kontrollzellen zeigten die typische langgestreckte, spindelförmige Morphologie von Fibroblasten, wohingegen die Patientenzellen eine plumpere und breitere Form aufwiesen und häufig zusätzliche Zellfortsätze ausbildeten. Die Unterschiede in der Zellgestalt waren auch nach Darstellung des Aktin-Zytoskeletts (anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper) erkennbar (**Abb. 6**).

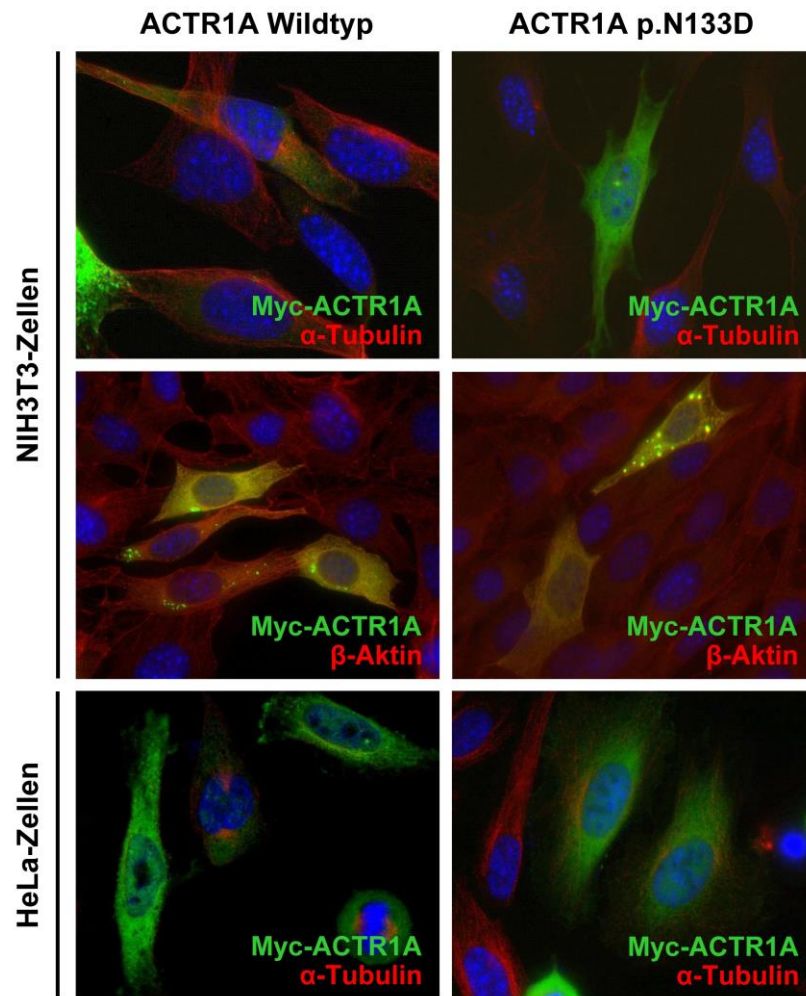


**Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation von ACTR1A in primären Fibroblasten**

Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit Antikörpern gegen ACTR1A und  $\beta$ -Aktin. Die Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). ACTR1A war diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt, wobei kein Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollfibroblasten feststellbar war. Es zeigten sich jedoch in der ACTR1A- und der  $\beta$ -Aktin-Färbung Unterschiede in der äußeren Form der Zellen. Während sich die Kontrollzellen langgestreckt und spindelförmig präsentierten, zeigten die Zellen des Patienten eine breitere, gedrungene Form. Vergrößerung x40.

Um wie in den zuvor beschriebenen Westernblot-Untersuchungen den Einfluss der p.N133D-Variante unabhängig von dem gleichzeitig in den Patientenzellen vorliegenden Wildtyp-ACTR1A darstellen zu können, wurden Transfektionsexperimente mit Myc-getagtem ACTR1A durchgeführt. In NIH3T3-Zellen und in HeLa-Zellen zeigte sich unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers für Wildtyp- und mutiertes ACTR1A ein ähnliches diffuses zytoplasmatisches Signal (**Abb. 7**), sodass sich auch in diesen Zellen kein Hinweis auf einen relevanten Einfluss der Mutation p.N133D auf die intrazelluläre Lokalisation von ACTR1A ergab. Bei diesen Versuchen, in denen mit NIH3T3 eine Fibroblastenzelllinie aus der Maus verwendet wurde, war der in den primären humanen Fibroblastenkulturen beobachtete fragliche Einfluss der ACTR1A-Mutante auf die Zellgestalt nicht nachvollziehbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass die auffällige Morphologie der Patientenfibroblasten durch eine höhere Passagezahl und Seneszenz der Zellen bedingt war [80]. Bezüglich des zur Verfügung stehenden Aliquots der Patientenzellen waren keine näheren Informationen zur Passagezahl erhältlich.





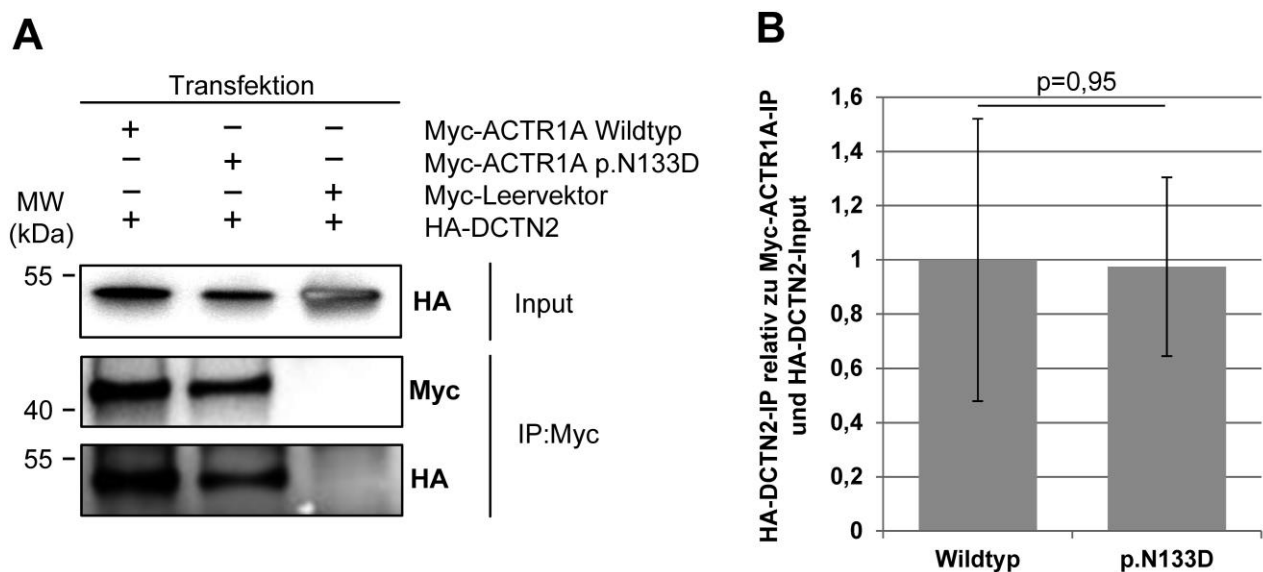
**Abb. 7: Subzelluläre Lokalisation von Myc-ACTR1A in transfizierten Zellen**

Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das Myc-Tag und  $\alpha$ -Tubulin bzw.  $\beta$ -Aktin nach Transfektion von NIH3T3- und HeLa-Zellen mit dem Wildtyp- bzw. p.N133D-Myc-ACTR1A-Plasmid. Die Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI). ACTR1A war diffus im Zytoplasma verteilt.  $\alpha$ -Tubulin- bzw.  $\beta$ -Aktin-Färbungen ermöglichten die Darstellung von Zellgröße und -form. Vergrößerung x40.

### 6.2.3 Bindung von ACTR1A an DCTN2

Die in der Familie A nachgewiesene Variante p.N133D befindet sich in einem Bereich des ACTR1A-Proteins, der innerhalb des Dynactin-Komplexes für die Bindung an DCTN2 (Dynamitin) verantwortlich ist [81-82]. Da somit ein Einfluss der ACTR1A-Mutation p.N133D auf die Interaktion zwischen ACTR1A und DCTN2 denkbar war, wurde das Bindungsverhalten der beiden Proteine mittels Co-Immunpräzipitation untersucht. Dazu wurden Cos7-Zellen mit HA-getagtem DCTN2 und entweder mit dem Wildtyp oder der p.N133D-Mutante von Myc-getagtem ACTR1A co-transfiziert. Aus den Zelllysaten wurde Myc-ACTR1A mithilfe von an Agarose immobilisierten anti-Myc-Antikörpern ausgefällt und anschließend mit einem Westernblot über-

prüft, ob bzw. in welchem Umfang HA-DCTN2 in den Proteinpräzipitaten nachweisbar war. Die Auswertung dieses Versuchs zeigte, dass HA-DCTN2 sowohl mit Wildtyp-Myc-ACTR1A als auch mit der p.N133D-Mutante interagieren kann. Zur Quantifizierung wurde die densitometrisch bestimmte Menge von co-präzipitiertem HA-DCTN2 auf die HA-DCTN2-Spiegel der Zellen und die Menge des präzipitierten Myc-ACTR1A bezogen. Hierbei war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und mutiertem Myc-ACTR1A erkennbar (ungepaarter zweiseitiger t-Test, **Abb. 8**). Den bisherigen Ergebnissen zufolge ist es damit unwahrscheinlich, dass die Mutation p.N133D einen relevanten Einfluss auf die Interaktion zwischen ACTR1A und DCTN2 hat.



**Abb. 8: Co-Immunpräzipitation von Myc-ACTR1A und HA-DCTN2**

**(A) Westernblot und Immunpräzipitation**

Cos7-Zellen wurden nach dem abgebildeten Schema transfiziert und das Vorhandensein von HA-DCTN2 im Zelllysat bestätigt (Input). Nach Immunpräzipitation mit anti-Myc-Antikörpern wurden die (co-)präzipitierten Proteine in der IP-Fraktion detektiert (IP: Myc). Mit HA-DCTN2 und einem pCMV-Myc-Leervektor transfizierte Zellen dienten als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation. MW = Molekulargewicht.

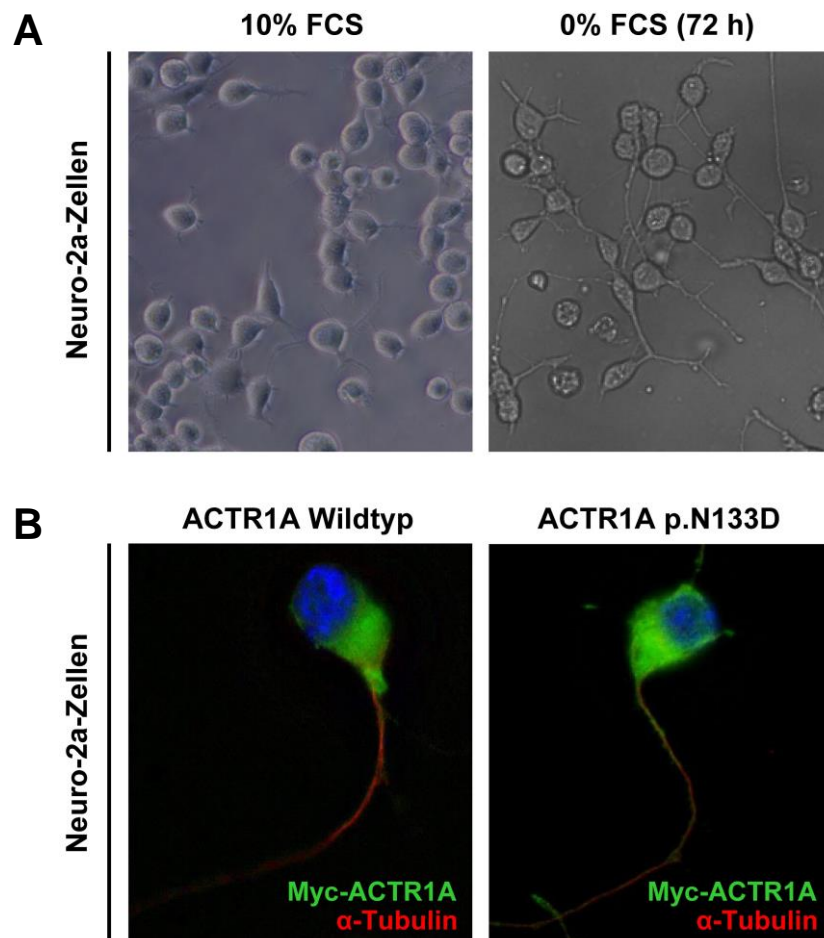
**(B) Quantifizierung von co-präzipitiertem DCTN2**

Die Menge des gebundenen HA-DCTN2 wurde auf die Myc-ACTR1A-Menge in der IP-Fraktion und die HA-DCTN2-Spiegel im Zelllysat normalisiert (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). Die statistische Auswertung (ungepaarter zweiseitiger t-Test) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Co-Immunpräzipitation mit Wildtyp- und mutiertem Myc-ACTR1A.

## 6.2.4 Einfluss von ACTR1A auf die Differenzierung von Neuro-2a-Zellen

Die murine Neuroblastomzelllinie Neuro-2a kann unter geeigneten Kulturbedingungen zur Differenzierung und damit Bildung von neuritenartigen Zellausläufern angeregt werden [57] (**Abb. 9**). Um einen potentiellen Effekt von ACTR1A auf die Neuritenbildung unter Differenzierungs-

bedingungen nachzuweisen, wurden Neuro-2a-Zellen mit Konstrukten für Wildtyp- und mutiertes ACTR1A transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die der Transfektionsprozedur unterzogen wurden, jedoch kein Expressionskonstrukt aufgenommen hatten bzw. keine detektierbaren Mengen von Myc-ACTR1A exprimierten. In Neuro-2a-Zellen war – wie zuvor in nicht-neuronalen Zellen – kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation von Wildtyp- und mutiertem Myc-ACTR1A erkennbar (Abb. 9).



**Abb. 9: Differenzierung von Neuro-2a-Zellen und Lokalisation von Myc-ACTR1A**

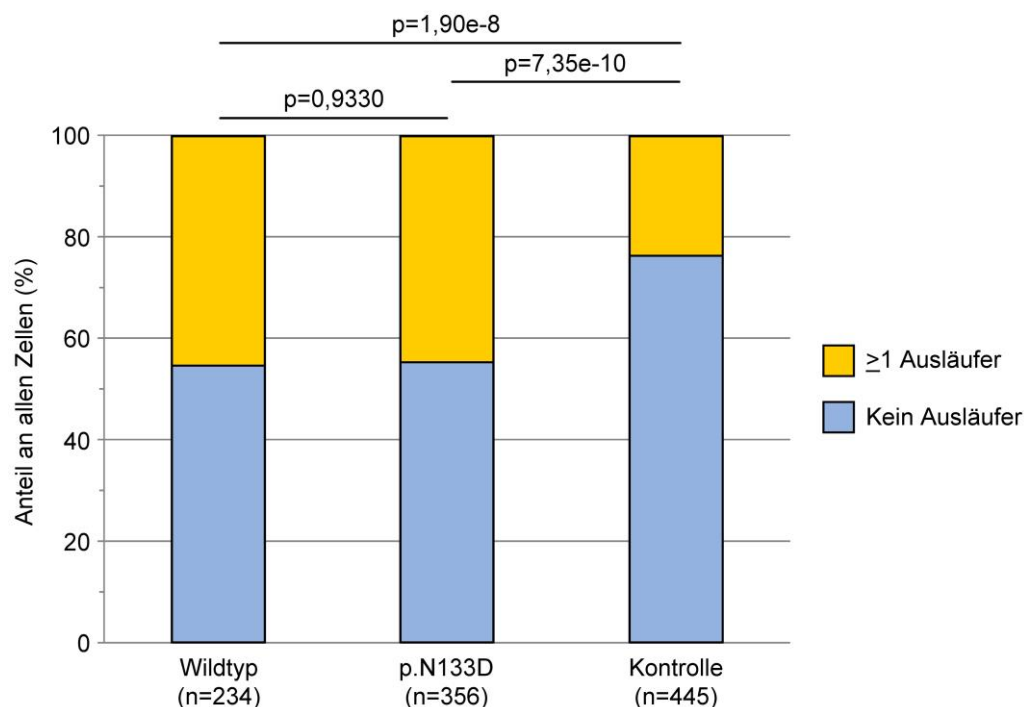
**(A) Differenzierung von Neuro-2a-Zellen**

Lichtmikroskopische Darstellung von Neuro-2a-Zellen nach Kultivierung in Wachstums- oder Differenzierungsmedium (72 h DMEM ohne FCS). Unter Differenzierungsbedingungen bildete ein Teil der Zellen lange neuritenartige Ausläufer. Vergrößerung x40.

**(B) Subzelluläre Lokalisation von Myc-ACTR1A in differenzierten Neuro-2a-Zellen**

Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern nach Transfektion mit dem Wildtyp- bzw. p.N133D-Myc-ACTR1A-Plasmid und anschließender Kultivierung in Differenzierungsmedium. Die Zellkerne erscheinen blau (DAPI). ACTR1A war diffus im Zytoplasma verteilt. Die α-Tubulin-Färbung ermöglichte neben der Darstellung von Zellgröße und -form auch die Visualisierung der Zellausläufer. Vergrößerung x40.

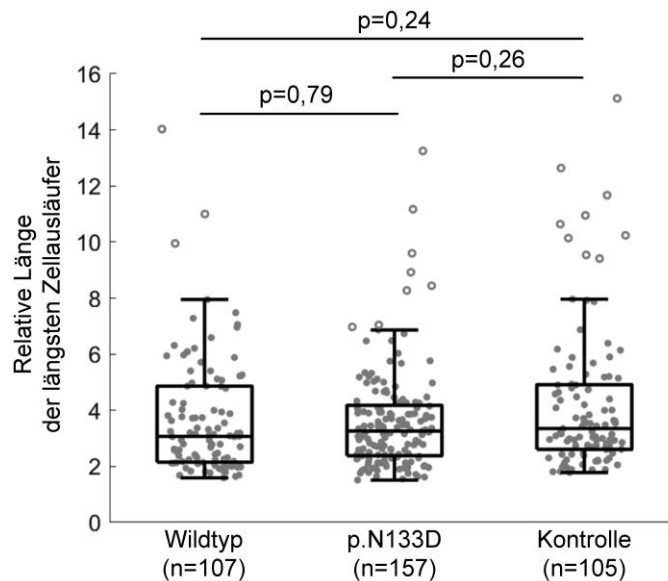
Zunächst wurde überprüft, wie viele Neuro-2a-Zellen unter Differenzierungsbedingungen mindestens einen neuritenähnlichen Ausläufer bildeten (= Zellfortsatz, dessen Länge mindestens dem 1,5-fachen Querdurchmesser des Zellkörpers entspricht). Von den nicht Myc-ACTR1A-exprimierenden Zellen zeigten 23,82 % und von den mit Wildtyp-ACTR1A transfizierten Zellen 45,30 % derartige Fortsätze. Für die p.N133D-Mutante fand sich mit 44,66 % ein mit dem Wildtyp vergleichbarer Wert. Die statistische Auswertung zeigte im Vergleich zur Kontrollbedingung einen signifikanten Einfluss sowohl von Wildtyp- als auch von mutiertem ACTR1A (Wildtyp vs. Kontrolle  $p = 1,90e-8$ , Mutante vs. Kontrolle  $p = 7,35e-10$ , Exakter Fisher-Test [83]), während der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante nicht signifikant war ( $p = 0,9330$ , Exakter Fisher-Test) (Abb. 10).



**Abb. 10: Anteil von Neuro-2a-Zellen mit neuritenartigen Ausläufern**

Neuro-2a-Zellen wurden mit Wildtyp- oder mutierten Myc-ACTR1A-Plasmiden transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die kein Myc-ACTR1A exprimierten. Nach Kultur in Differenzierungsmedium wurde die Bildung von Zellausläufern erfasst. Die statistische Auswertung (Exakter Fisher-Test) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Myc-ACTR1A-exprimierenden Zellen (sowohl Wildtyp als auch Mutante) und Kontrollzellen. Der Effekt der Mutante unterschied sich nicht von dem Effekt des Wildtyps.

Im Folgenden wurde die Länge der jeweils längsten Ausläufer differenzierter Zellen relativ zum Querdurchmesser des Zellkörpers bestimmt. Die statistische Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die kein Myc-ACTR1A exprimierten, und mit Wildtyp- oder mutiertem Myc-ACTR1A transfizierten Zellen (Wildtyp vs. Mutante  $p = 0,79$ , Wildtyp vs. Kontrolle  $p = 0,24$ , Mutante vs. Kontrolle  $p = 0,26$ , Mann-Whitney-U-Test [84]) (Abb. 11).

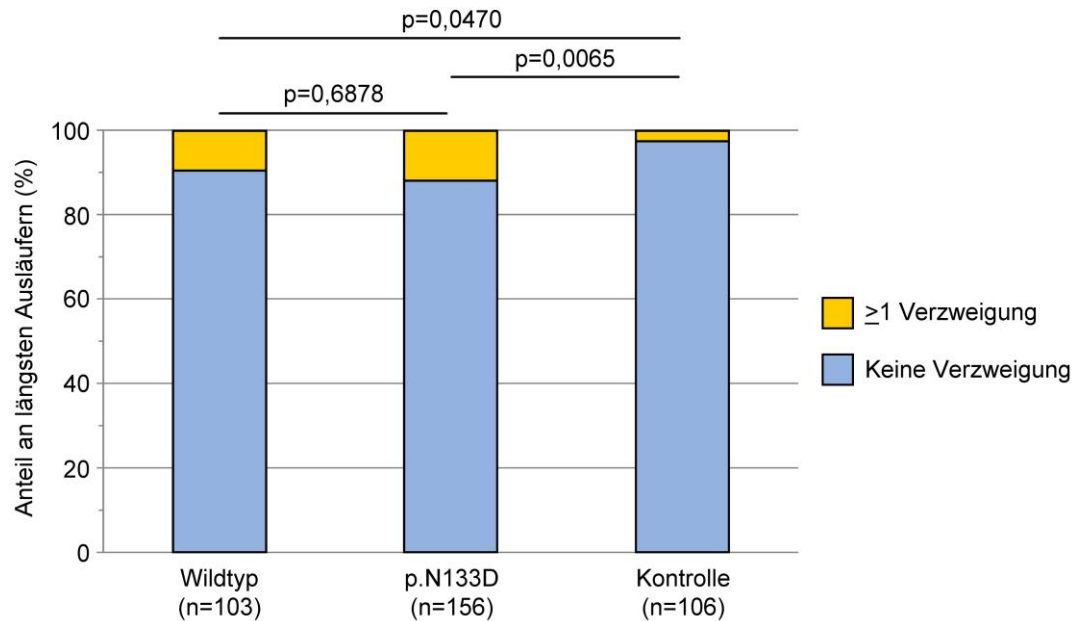


**Abb. 11: Länge des längsten neuritenartigen Ausläufers differenzierter Neuro-2a-Zellen**

Neuro-2a-Zellen wurden entweder mit Wildtyp- oder p.N133D-ACR1A-Plasmiden transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die kein Myc-ACR1A exprimierten. Die Fortsatzlänge ist als Verhältnis der Länge des längsten Fortsatzes einer Zelle zum Querdurchmesser des Zellkörpers dargestellt. Leere Punkte repräsentieren Ausreißer, die um mehr als den 1,5-fachen Interquartilsabstand unterhalb des unteren bzw. oberhalb des oberen Quartils liegen. Die statistische Auswertung (U-Test) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Bedingungen.

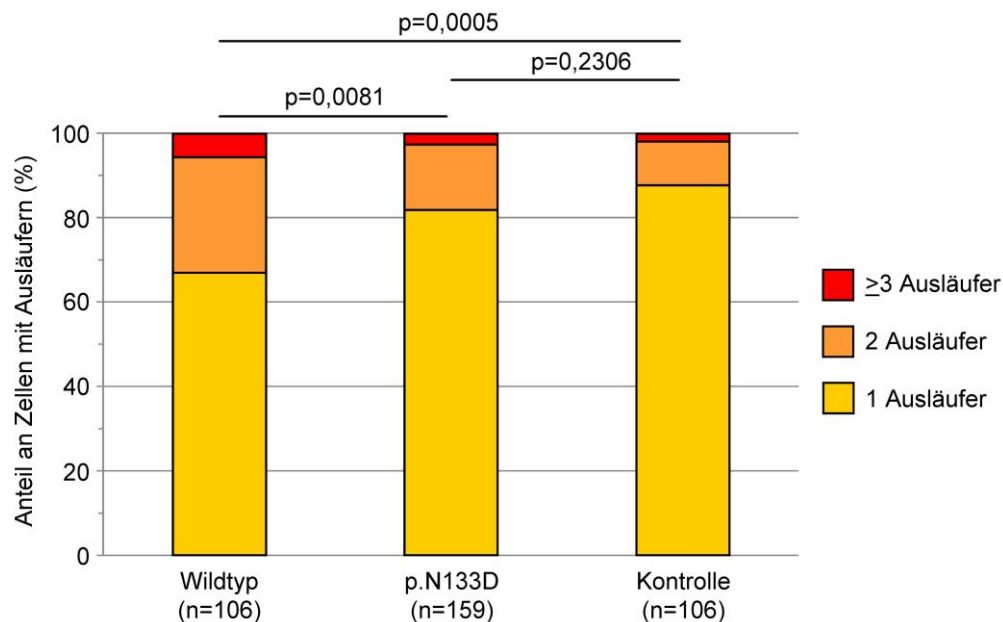
Die jeweils längsten Zellausläufer wurden auch in Bezug auf ihre Komplexität beurteilt. Bei fortsatztragenden Zellen ohne Myc-ACR1A-Expression zeigten 2,83 % der Fortsätze mindestens eine Verzweigung, bei mit Myc-ACR1A-Wildtyp und -Mutante transfizierten Zellen 9,71 % bzw. 12,18 %. Während Wildtyp- und mutiertes Myc-ACR1A im Vergleich zur Kontrolle einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Neuritenverzweigungen hatten (Wildtyp vs. Kontrolle  $p = 0,0470$ , Mutante vs. Kontrolle  $p = 0,0065$ , Exakter Fisher-Test), war der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante nicht signifikant ( $p = 0,6878$ , Exakter Fisher-Test) (**Abb. 12**).

Schließlich wurden die Daten mit der Fragestellung analysiert, wie viele neuritenähnliche Zellausläufer eine einzelne Neuro-2a-Zelle bildete. Von fortsatztragenden Zellen, die Wildtyp-Myc-ACR1A-Expression zeigten, hatten 33,02 % zwei oder mehr Ausläufer, von die Mutante exprimierenden fortsatztragenden Zellen 18,23 % und von fortsatztragenden Zellen ohne Myc-ACR1A-Expression 12,26 %. Damit hatten Wildtyp-ACR1A exprimierende Zellen signifikant häufiger mehr als einen Fortsatz, und zwar sowohl im Vergleich zu Zellen, bei denen keine Myc-ACR1A-Expression nachweisbar war ( $p = 0,0005$ , Exakter Fisher-Test), als auch im Vergleich zu Zellen, die mutiertes Myc-ACR1A exprimierten ( $p = 0,0081$ , Exakter Fisher-Test). Der Unterschied zwischen Zellen mit der p.N133D-Mutante und Zellen ohne Myc-ACR1A-Expression war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,2306$ , Exakter Fisher-Test) (**Abb. 13**).



**Abb. 12: Verzweigungen neuritenartiger Zellausläufer differenzierter Neuro-2a-Zellen**

Neuro-2a-Zellen wurden mit dem Wildtyp- oder mutierten Myc-ACTR1A-Plasmid transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die kein Myc-ACTR1A exprimierten. Sowohl Wildtyp- als auch mutiertes Myc-ACTR1A erhöhten die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Verzweigungen der Ausläufer differenzierter Neuro-2a-Zellen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante war nicht nachweisbar. Statistische Auswertung: Exakter Fisher-Test.



**Abb. 13: Anzahl neuritenartiger Zellausläufer differenzierter Neuro-2a-Zellen**

Neuro-2a-Zellen wurden mit dem Wildtyp- oder mutierten Myc-ACTR1A-Plasmid transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die kein Myc-ACTR1A exprimierten. Differenzierte Zellen (mindestens ein Zellausläufer) wurden hinsichtlich der Anzahl ihrer Zellfortsätze analysiert. Wildtyp-ACTR1A erhöhte im Vergleich zu Kontrollzellen die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von mehr als einem neuritenartigen Fortsatz. Die p.N133D-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen deutlich abgeschwächten Effekt, wobei der Unterschied statistisch signifikant war. Statistische Auswertung: Exakter Fisher-Test.

## 7. Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde *ACTR1A* als neues Kandidatengen für eine erbliche Neuropathie identifiziert. Diese Schlussfolgerung basiert auf den Ergebnissen molekulargenetischer Untersuchungen in einer betroffenen Familie, der Beurteilung der nachgewiesenen Genvariante mit bioinformatischen Algorithmen und Überlegungen zur Funktion des mutierten Proteins im Nervensystem. Außerdem können Ergebnisse zellbiologischer Experimente im Sinne der pathogenetischen Relevanz der *ACTR1A*-Variante gedeutet werden. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Relevanz der *ACTR1A*-Mutation zu bestätigen und die Rolle von *ACTR1A* bei der Pathogenese hereditärer Neuropathien aufzuklären.

### 7.1 Die *ACTR1A*-Variante p.N133D als mögliche Ursache einer CMT2

Die *whole-exome*-Sequenzierung hat sich zu einer gängigen Methode zur Identifizierung von Krankheitsgenen für monogene Erkrankungen entwickelt [51-52] und wurde auch bei erblichen Neuropathien bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt [85-90]. Die Untersuchung der DNA-Proben von drei betroffenen Mitgliedern einer großen CMT2-Familie zeigte 16 seltene, nicht-synonyme Sequenzvarianten, die bei allen drei Personen gleichzeitig vorlagen. Durch Einbeziehung weiterer erkrankter und nicht betroffener Angehöriger konnten die infrage kommenden Genvarianten schließlich auf eine einzige Variante c.397A>G (p.N133D) im *ACTR1A*-Gen eingegrenzt werden. Eine Limitation der vorliegenden Arbeit ist, dass es nicht gelang, unter 89 weiteren CMT2-Patienten Fälle mit Mutationen im *ACTR1A*-Gen zu identifizieren. Auch ein in der Literatur berichtetes Screening von 136 Patienten mit einer erblichen Neuropathie auf Mutationen in Genen für Bestandteile des Dynactin-Komplexes, darunter auch *ACTR1A*, konnte keine eindeutig krankheitsverursachenden Genvarianten nachweisen [91]. Eine denkbare Erklärung ist, dass *ACTR1A*-Mutationen nur einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtheit aller CMT-Fälle ausmachen und weitere entsprechende Genvarianten möglicherweise erst durch Untersuchung noch größerer Patientenserien entdeckt werden. Auch einige andere CMT-Gene wurden bislang nur in einer oder zwei Familien beschrieben oder erst mehrere Jahre nach der Erstbeschreibung durch den Nachweis von Mutationen bei weiteren Patienten bestätigt (z. B. [90, 92-98]).

Es ist nicht gänzlich auszuschließen, dass für das Auftreten der erblichen Neuropathie in der hier beschriebenen Familie statt der *ACTR1A*-Variante eine Mutation in einem anderen Gen verant-

wortlich ist, die mittels *whole-exome*-Sequenzierung nicht detektiert werden konnte. Obwohl sich der größte Teil aller bekannten krankheitsverursachenden Genmutationen in kodierenden Bereichen des Genoms befindet [99], kann die eigentlich verantwortliche Variante beispielsweise auch in nicht-kodierenden Exons oder Exonabschnitten, Intronsequenzen oder intergenischen Regionen liegen, die bei der *whole-exome*-Sequenzierung methodenbedingt nicht erfasst wurden. Außerdem wird bei dieser Sequenzierungsform regelmäßig ein Teil der Zielsequenzen nicht oder unzureichend abgedeckt [100], wodurch selbst Varianten in kodierenden DNA-Abschnitten dem Nachweis entgehen können. Darüber hinaus ist die Detektion von genomischen Imbalancen (z. B. Deletion eines oder mehrerer Exons) mit den zur *whole-exome*-Sequenzierung verwendeten Anreicherungsverfahren nur eingeschränkt möglich [101], sodass eine derartige Mutation unentdeckt geblieben sein kann. Schließlich ist zu berücksichtigen, dass die eigentlich ursächliche Mutation durch die in dieser Studie vorgenommene Filterung und Priorisierung der Ergebnisse aus der *whole-exome*-Sequenzierung fälschlicherweise ausgeschlossen worden sein könnte. Alle diese Überlegungen treffen naturgemäß insbesondere auf solche Varianten zu, die in einem starken Kopplungsungleichgewicht mit dem *ACTR1A* c.397A>G-Allel stehen und deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam (gekoppelt) vererbt werden. In einem derartigen Szenario hätte die vorliegende Studie mit der *ACTR1A*-Variante zwar einen genetischen Marker für eine neue CMT-Form, nicht jedoch den krankheitsauslösenden Gendefekt selbst entdeckt.

## 7.2 Plausibilität des Kandidatengens *ACTR1A* und der p.N133D-Variante

Trotz der im vorangehenden Abschnitt angesprochenen Einschränkungen erscheint es wahrscheinlich, dass die nachgewiesene *ACTR1A*-Variante für die Neuropathie in der beschriebenen Familie verantwortlich ist. Das *ACTR1A*-Protein und speziell der von der Mutation betroffene Aminosäurerest sind in unterschiedlichen Spezies während der Evolution hoch konserviert [39, 41], was als Beleg für die biologische Relevanz dieser Sequenz angesehen werden kann. Entsprechend stuften bioinformatische Algorithmen die Variante p.N133D übereinstimmend als pathogen ein. Auch unter funktionellen Gesichtspunkten ist *ACTR1A* ein plausibles Kandidatengen für eine axonale Neuropathie. *ACTR1A* ist ein Bestandteil des Dynactin-Komplexes, der für intrazelluläre Transportprozesse, insbesondere in den langen Axonen von Neuronen im peripheren Nervensystem, erforderlich ist. Störungen des axonalen Transports sind inzwischen ein etablierter Krankheitsmechanismus bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen (Übersicht in [26]). Besonders erwähnenswert ist, dass Mutationen im *DCTN1*-Gen, das für den p150-Bestandteil des Dynactin-Komplexes kodiert, zu Motoneuronerkrankungen führen [102-103], wobei ein ab-



normer axonaler Transport für die Pathogenese wesentlich ist [104-106]. Auch Mutationen in Genen, die für mit dem Dynactin-Komplex unmittelbar assoziierte Proteine kodieren, wurden bereits mit erblichen Motoneuronerkrankungen (Adapterprotein BICD2 [107-109]) und Neuropathien (schwere Kette des zytoplasmatischen Dynein 1 [85]) in Verbindung gebracht.

### **7.3 Auswirkungen der p.N133D-Variante auf das ACTR1A-Protein**

Bei Untersuchungen zu Auswirkungen der p.N133D-Variante auf Expressionslevel und subzelluläre Lokalisation des ACTR1A-Proteins war in Patientenfibroblasten und transfizierten nicht-neuronalen Zellen kein Unterschied zwischen Wildtyp- und mutiertem Protein erkennbar. Auch im Hinblick auf die bekannte ACTR1A-DCTN2-Interaktion [81-82] zeigte sich kein spezifischer Effekt der Mutante. Somit konnte bisher auf molekularer Ebene kein möglicher Pathomechanismus für die ACTR1A-Variante p.N133D nachgewiesen werden. In Anbetracht der auf das periphere Nervensystem begrenzten Symptome einer CMT ist es vorstellbar, dass Effekte der ACTR1A-Variante nur oder deutlicher in Neuronen nachweisbar sind. Bezüglich der subzellulären Lokalisation fand sich jedoch auch in Neuro-2a-Zellen zunächst kein entsprechender Hinweis. Für weitergehende Untersuchungen bieten sich beispielsweise andere geeignete neuronale Zelllinien oder Neurone an, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) eines Patienten (gewonnen durch Reprogrammierung von Hautfibroblasten oder Leukozyten [110-111]) differenziert werden [112-113].

### **7.4 Einfluss von ACTR1A auf die Neuritenbildung von Neuro-2a-Zellen**

Die erste morphologische Veränderung bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen ist die Bildung von langen, dünnen Zellausläufern (Neuriten). Bei diesem Prozess spielen neben dem Actin-Zytoskelett offensichtlich auch Mikrotubuli [114-115], Dynein-Motorproteine und der Adapterkomplex Dynactin [34-35] eine wichtige Rolle. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche Auswirkungen von Wildtyp- und p.N133D-ACTR1A auf die Differenzierung von Neuro-2a-Zellen, einer etablierten neuronalen Zelllinie, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Wildtyp-ACTR1A die Differenzierung von Neuro-2a-Zellen fördert: So bildet im Vergleich zu Kontrollzellen ein größerer Anteil von Wildtyp-ACTR1A-überexprimierenden Zellen unter Differenzierungsbedingungen Ausläufer, die zudem stärker verzweigt sind. Außerdem wiesen differenzierte Wildtyp-ACTR1A-überexprimierende Neuro-2a-Zellen häufiger mehr als einen neuritenartigen Ausläufer auf. Unterschiede bezüglich der Länge der einzelnen Fortsätze

konnten hingegen nicht beobachtet werden. Die Überexpression der ACTR1A-Variante p.N133D hatte im Wesentlichen vergleichbare Auswirkungen. Allerdings war gegenüber dem Wildtyp-Protein der Effekt auf die Anzahl der Ausläufer, die die Zellen bildeten, deutlich abgeschwächt, was darauf hindeuten könnte, dass die Mutante zu einem partiellen Verlust der Proteinfunktion führt. Dieses Ergebnis erscheint im Hinblick auf die Frage nach der Pathogenität der p.N133D-Variante interessant, bedarf aber zur Bestätigung der nochmaligen experimentellen Überprüfung, z. B. in weiteren neuronartigen Zelllinien oder Zellen aus patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen.

## 7.5 Gestörter axonaler Transport als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen

Angesichts der bekannten Funktion von Dynactin als Regulator des Mikrotubuli-abhängigen Transports und der Bedeutung effektiver intrazellulärer Transportvorgänge in Neuronen [26-27] ist es denkbar, dass Mutationen im Dynactin-Bestandteil ACTR1A den axonalen Transport stören und dadurch zum Auftreten einer Neuropathie führen. Tatsächlich wurde im Ortholog des *ACTR1A*-Gens in der Fruchtfliege eine Mutation beschrieben, die die Formation des Dynactin-Komplexes beeinträchtigt, den axonalen Transport von Vesikeln stört und zu verminderter Beweglichkeit der Fliegenlarven führt [116]. Um zu überprüfen, ob auch die humane ACTR1A p.N133D-Variante zu einem gestörten axonalen Transport führt, bietet sich beispielsweise die Analyse der Motilität von Mitochondrien oder Lysosomen in Neuro-2a-Zellen oder anderen neuronalen Zelllinien mittels *live cell imaging* an [117-118]. Ein weiterer naheliegender Ansatz ist die Untersuchung des axonalen Transports in neuronartigen Zellen, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit der p.N133D-Mutation gewonnen werden. In Modellen verschiedener neurologischer Erkrankungen mit gestörtem axonalen Transport, unter anderem der *HSPB1*- und *GARS*-assoziierten CMT2, konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Neuronen durch Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren verhindert werden kann [119-120], wobei der Effekt vermutlich auf der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik durch Modulation posttranslationaler Modifikationen (Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin) beruht [121]. Sofern ein gestörter axonaler Transport tatsächlich eine Rolle in der Pathogenese der *ACTR1A*-assoziierten CMT2 spielt, kann die Effizienz von HDAC-Inhibitoren zunächst in den oben erwähnten Zellkultursystemen getestet und - falls erfolgreich - damit eine mögliche therapeutische Option für diese Erkrankung aufgezeigt werden.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Tooth, H.H., *The peroneal type of progressive muscular atrophy*. 1886, University of Cambridge: Cambridge.
2. Kazamel, M. and C.J. Boes, *Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution*. J Neurol, 2015. **262**(4): p. 801-5.
3. Skre, H., *Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease*. Clin Genet, 1974. **6**(2): p. 98-118.
4. Dyck, P.J., et al., *Hereditary motor and sensory neuropathies*, in *Peripheral neuropathy*, P.J. Dyck, et al., Editors. 1993, W. B. Saunders: Philadelphia. p. 1094-1136.
5. Harding, A.E. and P.K. Thomas, *The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II*. Brain, 1980. **103**(2): p. 259-80.
6. Werheid, F., et al., *Underestimated associated features in CMT neuropathies: clinical indicators for the causative gene?* Brain Behav, 2016. **6**(4): p. e00451.
7. Pareyson, D. and C. Marchesi, *Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease*. Lancet Neurol, 2009. **8**(7): p. 654-67.
8. Young, P., et al., *Treatment for Charcot-Marie-Tooth disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. CD006052.
9. Passage, E., et al., *Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 396-401.
10. Gess, B., et al., *Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(12): p. CD011952.
11. Dyck, P.J. and E.H. Lambert, *Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies*. Arch Neurol, 1968. **18**(6): p. 603-18.
12. Dyck, P.J. and E.H. Lambert, *Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations*. Arch Neurol, 1968. **18**(6): p. 619-25.
13. Behse, F. and F. Buchthal, *Peroneal muscular atrophy (PMA) and related disorders. II. Histological findings in sural nerves*. Brain, 1977. **100 Pt 1**: p. 67-85.
14. Harding, A.E. and P.K. Thomas, *Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II)*. J Med Genet, 1980. **17**(5): p. 329-36.
15. Harding, A.E. and P.K. Thomas, *Autosomal recessive forms of hereditary motor and sensory neuropathy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1980. **43**(8): p. 669-78.
16. Pitceathly, R.D., et al., *Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease*. Neurology, 2012. **79**(11): p. 1145-54.
17. CMT-Consortium-ENMC, E., *4th Workshop of the European CMT-Consortium--62nd ENMC International Workshop: rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders 16-18 October 1998, Soestduinen, The Netherlands*. Neuromuscul Disord, 1999. **9**(4): p. 279-87.

18. Rudnik-Schoneborn, S., M. Auer-Grumbach, and J. Senderek, *Hereditary Neuropathies: Update 2017*. Neuropediatrics, 2017. **48**(4): p. 282-293.
19. Gess, B., et al., *Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population*. Neuromuscul Disord, 2013. **23**(8): p. 647-51.
20. Rudnik-Schoneborn, S., et al., *Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients*. Clin Genet, 2016. **89**(1): p. 34-43.
21. Saporta, A.S., et al., *Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies*. Ann Neurol, 2011. **69**(1): p. 22-33.
22. Murphy, S.M., et al., *Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012. **83**(7): p. 706-10.
23. Nelis, E., et al., *Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study*. Eur J Hum Genet, 1996. **4**(1): p. 25-33.
24. Weis, J., et al., *Towards a functional pathology of hereditary neuropathies*. Acta Neuropathol, 2017. **133**(4): p. 493-515.
25. Goldstein, L.S. and Z. Yang, *Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins*. Annu Rev Neurosci, 2000. **23**: p. 39-71.
26. Millecamps, S. and J.P. Julien, *Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(3): p. 161-76.
27. Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka, *Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease*. Neuron, 2010. **68**(4): p. 610-38.
28. Gill, S.R., et al., *Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein*. J Cell Biol, 1991. **115**(6): p. 1639-50.
29. Schroer, T.A., *Dynactin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 759-79.
30. Karki, S. and E.L. Holzbaur, *Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28806-11.
31. Holleran, E.A., et al., *Centractin (ARPI) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 2): p. 1815-29.
32. Waterman-Storer, C.M., S. Karki, and E.L. Holzbaur, *The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1634-8.
33. Muhua, L., T.S. Karpova, and J.A. Cooper, *A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration*. Cell, 1994. **78**(4): p. 669-79.
34. Dehmelt, L., et al., *A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation*. Brain Cell Biol, 2006. **35**(1): p. 39-56.

- 
35. Arens, J., T.T. Duong, and L. Dehmelt, *A morphometric screen identifies specific roles for microtubule-regulating genes in neuronal development of P19 stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79796.
  36. Schafer, D.A., et al., *Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin*. J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 403-12.
  37. Urnavicius, L., et al., *The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein*. Science, 2015. **347**(6229): p. 1441-1446.
  38. Paschal, B.M., et al., *Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15318-23.
  39. Lees-Miller, J.P., D.M. Helfman, and T.A. Schroer, *A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility*. Nature, 1992. **359**(6392): p. 244-6.
  40. Schroer, T.A., et al., *Actin-related protein nomenclature and classification*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 1777-8.
  41. Clark, S.W. and D.I. Meyer, *Centractin is an actin homologue associated with the centrosome*. Nature, 1992. **359**(6392): p. 246-50.
  42. Harlow, E. and D. Lane, *A laboratory manual: Antibodies*. 1988, Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
  43. Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch, *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
  44. Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. 1997, New York: John Wiley and Sons.
  45. Bonifacino, J.S., M. Dasso, and J.B. Harford, *Current Protocols in Cell Biology*. 2001, New York: John Wiley and Sons.
  46. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
  47. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
  48. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
  49. Innis, M.A., et al., *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9436-40.
  50. Prober, J.M., et al., *A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides*. Science, 1987. **238**(4825): p. 336-41.
  51. Gilissen, C., et al., *Disease gene identification strategies for exome sequencing*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(5): p. 490-7.
  52. Brown, T.L. and T.M. Meloche, *Exome sequencing a review of new strategies for rare genomic disease research*. Genomics, 2016. **108**(3-4): p. 109-114.

- 
53. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.
  54. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
  55. Higuchi, R., B. Krummel, and R.K. Saiki, *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7351-67.
  56. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
  57. Olmsted, J.B., et al., *Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **65**(1): p. 129-36.
  58. Evangelopoulos, M.E., J. Weis, and A. Kruttgen, *Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR*. Oncogene, 2005. **24**(20): p. 3309-18.
  59. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
  60. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**: p. 248-249.
  61. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations*. Nat Methods, 2010. **7**(8): p. 575-6.
  62. Choi, Y. and A.P. Chan, *PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels*. Bioinformatics, 2015. **31**(16): p. 2745-7.
  63. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
  64. Jagadeesh, K.A., et al., *M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity*. Nat Genet, 2016. **48**(12): p. 1581-1586.
  65. Kircher, M., et al., *A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants*. Nat Genet, 2014. **46**(3): p. 310-5.
  66. Rogers, M.F., et al., *FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features*. Bioinformatics, 2018. **34**(3): p. 511-513.
  67. Chun, S. and J.C. Fay, *Identification of deleterious mutations within three human genomes*. Genome Res, 2009. **19**(9): p. 1553-61.
  68. Reva, B., Y. Antipin, and C. Sander, *Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(17): p. e118.
  69. López-Ferrando, V., et al., *PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update*. Nucleic Acids Research, 2017. **45**(W1): p. W222-W228.
  70. Pollard, K.S., et al., *Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies*. Genome Res, 2010. **20**(1): p. 110-21.
  71. Davydov, E.V., et al., *Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(12): p. e1001025.

72. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
73. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-91.
74. Fu, W., et al., *Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants*. Nature, 2013. **493**(7431): p. 216-20.
75. Sudmant, P.H., et al., *An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 75-81.
76. Shaughnessy, J.D., Jr., et al., *Mrv1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2069-84.
77. Moela, P. and L.R. Motadi, *RBBP6: a potential biomarker of apoptosis induction in human cervical cancer cell lines*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 4721-35.
78. Malnic, B., P.A. Godfrey, and L.B. Buck, *The human olfactory receptor gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2584-9.
79. Student, *The probable error of a mean*. Biometrika, 1908. **6**: p. 1-25.
80. Kent, L.W., et al., *Effect of in vitro passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression*. Arch Oral Biol, 1996. **41**(3): p. 263-70.
81. Clark, S.W. and M.D. Rose, *Alanine scanning of Arp1 delineates a putative binding site for Jnm1/dynamin and Nip100/p150Glued*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 3999-4012.
82. Cheong, F.K., et al., *Dynactin integrity depends upon direct binding of dynamin to Arp1*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(14): p. 2171-80.
83. Fisher, R.A., *The Logic of Inductive Inference*. Journal of the Royal Statistical Society, 1935. **98**: p. 39-82.
84. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other*. Ann Math Statist, 1947. **18**: p. 50-60.
85. Weedon, M.N., et al., *Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(2): p. 308-12.
86. Auer-Grumbach, M., et al., *Rare Variants in MME, Encoding Metalloprotease Neprilysin, Are Linked to Late-Onset Autosomal-Dominant Axonal Polyneuropathies*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(3): p. 607-623.
87. Sevilla, T., et al., *Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease*. Brain, 2016. **139**(Pt 1): p. 62-72.
88. Rebelo, A.P., et al., *Cryptic Amyloidogenic Elements in the 3' UTRs of Neurofilament Genes Trigger Axonal Neuropathy*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(4): p. 597-614.
89. Lassuthova, P., et al., *Mutations in ATP1A1 Cause Dominant Charcot-Marie-Tooth Type 2*. Am J Hum Genet, 2018. **102**(3): p. 505-514.
90. Hong, Y.B., et al., *DGAT2 Mutation in a Family with Autosomal-Dominant Early-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease*. Hum Mutat, 2016. **37**(5): p. 473-80.

- 
91. Tey, S., et al., *Mutation analysis of genes within the dynactin complex in a cohort of hereditary peripheral neuropathies*. Clin Genet, 2016. **90**(2): p. 127-33.
  92. Vester, A., et al., *A loss-of-function variant in the human histidyl-tRNA synthetase (HARS) gene is neurotoxic in vivo*. Hum Mutat, 2013. **34**(1): p. 191-9.
  93. Safka Brozkova, D., et al., *Loss of function mutations in HARS cause a spectrum of inherited peripheral neuropathies*. Brain, 2015. **138**(Pt 8): p. 2161-72.
  94. Azzedine, H., et al., *PLEKHG5 deficiency leads to an intermediate form of autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(20): p. 4224-32.
  95. Maystadt, I., et al., *The nuclear factor kappaB-activator gene PLEKHG5 is mutated in a form of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(1): p. 67-76.
  96. Soong, B.W., et al., *Exome sequencing identifies GNB4 mutations as a cause of dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(3): p. 422-30.
  97. Lassuthova, P., et al., *Confirmation of the GNB4 gene as causal for Charcot-Marie-Tooth disease by a novel de novo mutation in a Czech patient*. Neuromuscul Disord, 2017. **27**(1): p. 57-60.
  98. Xu, W.Y., et al., *A nonsense mutation in DHTKD1 causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(6): p. 1088-94.
  99. Cooper, D.N., M. Krawczak, and S.E. Antonorakis, *The nature and mechanisms of human gene mutation*, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, et al., Editors. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 259-291.
  100. Sims, D., et al., *Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(2): p. 121-32.
  101. Samarakoon, P.S., et al., *Identification of copy number variants from exome sequence data*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 661.
  102. Puls, I., et al., *Mutant dynactin in motor neuron disease*. Nat Genet, 2003. **33**(4): p. 455-6.
  103. Munch, C., et al., *Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS*. Neurology, 2004. **63**(4): p. 724-6.
  104. Laird, F.M., et al., *Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 1997-2005.
  105. Levy, J.R., et al., *A motor neuron disease-associated mutation in p150Glued perturbs dynactin function and induces protein aggregation*. J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 733-45.
  106. Stockmann, M., et al., *The dynactin p150 subunit: cell biology studies of sequence changes found in ALS/MND and Parkinsonian syndromes*. J Neural Transm (Vienna), 2013. **120**(5): p. 785-98.
  107. Oates, E.C., et al., *Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 965-73.
  108. Peeters, K., et al., *Molecular defects in the motor adaptor BICD2 cause proximal spinal muscular atrophy with autosomal-dominant inheritance*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 955-64.



- 
109. Neveling, K., et al., *Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 946-54.
  110. Loh, Y.H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human blood*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5476-9.
  111. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
  112. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 877-86.
  113. Amoroso, M.W., et al., *Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells*. J Neurosci, 2013. **33**(2): p. 574-86.
  114. Hoogenraad, C.C. and F. Bradke, *Control of neuronal polarity and plasticity--a renaissance for microtubules?* Trends Cell Biol, 2009. **19**(12): p. 669-76.
  115. Dent, E.W., S.L. Gupton, and F.B. Gertler, *The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
  116. Haghnia, M., et al., *Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 2081-9.
  117. Gowrishankar, S., Y. Wu, and S.M. Ferguson, *Impaired JIP3-dependent axonal lysosome transport promotes amyloid plaque pathology*. J Cell Biol, 2017. **216**(10): p. 3291-3305.
  118. Course, M.M., et al., *Live Imaging Mitochondrial Transport in Neurons*. Neuromethods, 2017. **123**: p. 49-66.
  119. Mo, Z., et al., *Aberrant GlyRS-HDAC6 interaction linked to axonal transport deficits in Charcot-Marie-Tooth neuropathy*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1007.
  120. d'Ydewalle, C., et al., *HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease*. Nat Med, 2011. **17**(8): p. 968-74.
  121. Zilberman, Y., et al., *Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3531-41.

---

## 9. Elektronische Datenbanken und Internetressourcen

1000Genomes: <http://www.internationalgenome.org/>

CADD: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

CLUSTALW: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

EVS: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

ExAc: <http://exac.broadinstitute.org/>

FATHMM: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

GERP++: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

HapMap: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/projhapmap/>

LRT: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

M-CAP: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

MutationAssessor: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

MutationTaster2: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

PhastCons: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

PhyloP: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

PMut: <http://mmb.pcb.ub.es/PMut/analyses/new/>

PolyPhen-2: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

Primer3: <http://primer3.ut.ee/>

PROVEAN: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

RefSeq: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>

SIFT: Zugriff über <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>

UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/index.html>

## 10. Anhang

### 10.1 Primer-Sequenzen

#### Primer für die Segregationsanalyse von Varianten aus der *whole-exome*-Sequenzierung

Zielsequenz	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
<i>SELL</i> c.176A>T	SELL_F SELL_R	TTCCGCCTTGTTTTGTATGG TCTTGCAGATTCCTGGCAC
<i>SRGAP3</i> c.3034C>G	SRGAP3_F SRGAP3_R	ATCATCTCGGTGGAGGAGC GTGCTGGACACCCTGGAG
<i>REV3L</i> c.657A>G	REV3L_F REV3L_R	AATGTCAAGGTTTGTCTTCTGTTAAG GGATCCTGCAAGAATCATTTATC
<i>KIAA2026</i> c.3713C>T	KIAA2026_F KIAA2026_R	TGTGCAAAACAGTTGAAGGAAC AGAATGCAGTTTCAGCAGCC
<i>PSIP1</i> c.1502_1503del	PSIP1_F PSIP1_R	AACACACAAGACCCATTAATAAAC TGATGCTCAAGATGGTAATCAG
<i>ACTR1A</i> c.397A>G	ACTR1A_F ACTR1A_R	AGCCAGCTGCTACTCACAGG GACTGAGGCGCCTTTAAACC
<i>MRVII</i> c.925G>A	MRVII_F MRVII_R	GGTTGGACTTCTCGGCAG CAAAGGCCTAGCTCCTGTTAC
<i>PDHX</i> c.1322C>A	PDHX_F PDHX_R	CCCTAGTATTTCCAACCTGGGG TTGGCATTTCCCTCTTCATC
<i>TUT1</i> c.643C>T	TUT1_F TUT1_R	CCAGGGAAGAACTCTGTGAAG AGCGCTAGCTGAGGCTG
<i>CARNS1</i> c.2419G>A	CARNS1_F CARNS1_R	CACCAGAGCAGGAGGCAC TTGATCTCGATAAGCCGAGG
<i>ADAMTS8</i> c.2536A>C	ADAMTS8_F ADAMTS8_R	GAGGGGTCCCTGCACTC CAACCACCAACATCATCCAG
<i>STRA6</i> c.2087C>T	STRA6_F STRA6_R	CAGGAACATGCCTCAGCAC GGGGTCTGGCCTACACG
<i>RBBP6</i> c.2407C>T	RBBP6_F RBBP6_R	CTCAAGCGTTTAGGGGACAG TCTCTCCCATTCTCGGTAGC
<i>COLEC12</i> c.332T>C	COLEC12_F COLEC12_R	TCCAGCGTATCCTTGTTCTTG CCAGGTGACCAAACTGGG
<i>UMODL1</i> c.395C>G	UMODL1_F UMODL1_R	TTTCTCCCAGCCCTGAATC CTGACCAGGGGCAGCAC

#### *ACTR1A*-Primer für die Mutationssuche

Zielsequenz	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
Exon 1	ACTR1A_1F ACTR1A_1R	TAAACTAGGCGGGCAACAAA TGTGATAAGGGGAGGAAGGA
Exon 2	ACTR1A_2F ACTR1A_2R	GGCCGCTTCTTTTCTTAAA ACTCCAAACTCGGCTCCTGT
Exon 3	ACTR1A_3F ACTR1A_3R	CAAGACCACAGGCTGTTCTT CAAGACCACAGGCTGTTCTT

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

(Fortsetzung von der vorigen Seite)

Zielsequenz	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
Exon 4	ACTR1A_4F ACTR1A_4R	AGGCTTCTTTGCAAGGGATT CATCGTCCTCCTCATCATCT
Exon 5	ACTR1A_5F ACTR1A_5R	TCTGAACCATTCCAGAGGAGA TCTGAACCATTCCAGAGGAGA
Exon 6	ACTR1A_6F ACTR1A_6R	CCTGGGCTTCCTTAGTACCC GGAAGAACAAGGCCTCACC
Exon 7	ACTR1A_7F ACTR1A_7R	GGCCATCACAACGTTTAGACA CCAGACTCCAGACCCTGATG
Exon 8+9	ACTR1A_8_9F ACTR1A_8_9R	GCCTTCATAGCCACCCAGT GCTTGGGCAAAGCTAGAGG
Exon 10	ACTR1A_10F ACTR1A_10	CCTGCCATGGGCAGAAAG GGAAACCCAGAGGAACTGTG
Exon 11	ACTR1A_11F ACTR1A_11R	AAAAGCCTGATTTGGTTTGG GCACTCACACACAGGCAGTT

**ACTR1A-Klonierungsprimer**

Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
ACTR1Ahum_EcoRI	ATGAATTCTCGCCATGGAGTCCTACGATGT
ACTR1Ahum_KpnI	AAGGTACCAAGCACTCACACACAGGCAGTT

**DCTN2-Klonierungsprimer**

Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
DCTN2hum_EcoRI_F	GATGAATTCAACCCATGGCGGACCCTAAATACG
DCTN2hum_XhoI_R	ATATCTTCTCGAGGTCCAAATGTGCTCACTTTCCAG

**ACTR1A-Mutageneseprimer**

Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
ACTR1Ahum_MutIIIF	TCGAGACCTTCGATGTGCC
ACTR1Ahum_MutIIR	GGGCACATCGAAGGTCTCGA

**M13-Universalprimer**

Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
M13_Foward	GTAAAACGACGGCCAG
M13_Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

**pCMV-Sequenzierprimer**

Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' - 3'
pCMV_Foward	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC
pCMV_Reverse	ATAGCATCACAAATTTACAAATAAAG

## 10.2 Verwendete Antikörper

### Primäre Antikörper

Bezeichnung des Antikörpers	Klonalität	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller	Produkt-nummer
c-Myc Monoclonal Antibody	monoklonal	Maus	WB: 1 : 100 IF: 1 : 100	Clontech, Mountain View, USA	#631206
Anti-Arp1 $\alpha$ /Centractin antibody produced in rabbit	polyklonal	Kaninchen	WB: 1 : 1.000 IF: 1 : 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A5601
Purified anti-HA.11 Epitope Tag Antibody	monoklonal	Maus	WB: 1 : 1.000 IF: 1 : 1.000	Covance, Princeton, USA	MMS-101P
Anti-GFP antibody	polyklonal	Kaninchen	WB: 1 : 10.000	Abcam, Milton, UK	ab290
$\alpha$ -Tubulin Antibody	polyklonal	Kaninchen	WB: 1 : 1.000	Cell Signaling Technology Danvers, USA	#2144S
Actin Antibody	polyklonal	Ziege	IF: 1 : 50	Santa Cruz, Dallas, USA	S1616

WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenzmikroskopie

### Sekundäre Antikörper

Bezeichnung des Antikörpers	Klonalität	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller	Produkt-nummer
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	polyklonal	Ziege	WB: 1 : 10.000	Cell Signaling Technology Danvers, USA	#7074
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Light Chain Specific	polyklonal	Ziege	WB: 1 : 10.000	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	115-035-174
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	polyklonal	Kaninchen	WB: 1 : 15.000	Dako, Hamburg, Deutschland	P0260
Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	polyklonal	Ziege	IF: 1 : 500	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11008
F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	polyklonal	Ziege	IF: 1 : 500	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11017
Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	polyklonal	Ziege	IF: 1 : 500	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11012
Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	polyklonal	Ziege	IF: 1 : 500	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11032
Alexa Fluor 594 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	polyklonal	Esel	IF: 1 : 500	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	705-585-147

WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenzmikroskopie

### 10.3 Ergebnisse der *whole-exome*-Sequenzierung

Parameter	A.1	A.7	A.12
Erhaltene Sequenz	10,52 Gb	8,9 Gb	7,66 Gb
<i>Total reads</i>	104.166.002	88.131.308	75.888.675
<i>Mapped reads</i> (Anteil an <i>total reads</i> )	99,22 %	99,05 %	99,2 %
Durchschnittliche Abdeckung ( <i>coverage</i> )	137,4x	115,92x	100,41x
Abdeckung $\geq 1x$	99,74 %	99,85 %	99,8 %
Abdeckung $\geq 4$	99,29 %	99,41 %	99,19 %
Abdeckung $\geq 8$	99,14 %	99,23 %	98,81 %
Abdeckung $\geq 20$	95,02 %	94,47 %	92,15 %
Detektierte Varianten	72.455	73.003	72.181
Seltene Varianten	479	483	498
Seltene, nicht-synonyme Varianten	151	138	147
Gemeinsame seltene, nicht-synonyme Varianten		16	

Seltene Varianten sind alle detektierten Varianten ohne Hap-Map-SNPs mit einer mittleren Heterozygotie-Rate von  $\geq 0,02$  (dbSNP135) und ohne Varianten, die in  $> 2$  von  $> 6.000$  internen *whole-exome*-Datensätzen von Patienten mit anderen Erkrankungen vorkommen. Nicht-synonyme Varianten sind *nonsense*-, *frame-shift*-, *splice*-, *missense*- und *in-frame-indel*-Varianten.

## 10.4 *In silico*-Vorhersagen zur Pathogenität der ACTR1A p.N133D-Variante

Verwendeter Algorithmus	Vorhersage
PolyPhen-2-Vorhersage (Score)	Possibly damaging (0,87)
MutationTaster2-Vorhersage (Score)	Disease causing (1)
PROVEAN-Vorhersage (Score)	Damaging (-4,28)
SIFT-Vorhersage (Score)	Deleterious (0,02)
M-CAP-Vorhersage (Score)	Damaging (0,16)
CADD-Vorhersage ( <i>phred-like rank</i> -Score)	Damaging (25,3)
FATHMM-Vorhersage (Score)	Damaging (-4,38)
LRT-Vorhersage (LRT <sub>new</sub> -Score)	Deleterious (1)
MutationAssessor-Vorhersage (Score)	Medium (2,39)
PMut-Vorhersage (Score)	Disease (0,82)
GERP-Score	6,04
PhastCons100way-Score	1
PhyloP100way-Score	8,02

PolyPhen-2-Scores [60] und MutationTaster2-Scores [61] nahe dem Wert 1, PROVEAN-Scores [62]  $\leq -2,50$ , SIFT-Scores [63]  $\leq 0,05$ , M-CAP-Scores [64]  $> 0,025$  und CADD *phred-like rank*-Scores [65]  $> 15$  (oder  $> 20$  für eine konservativere Einschätzung) zeigen an, dass eine Variante die Proteinfunktion stört. FATHMM-Scores [66] reichen von -16,13 bis 10,64; je kleiner der Score, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante pathogen ist. LRT<sub>new</sub>-Scores [67] reichen von 0 bis 1, wobei höhere Werte dafür sprechen, dass die Variante die Funktion des Proteins beeinträchtigt. MutationAssessor-Scores [68] können Werte zwischen -5,14 und 6,49 annehmen. Je höher der Score, desto wahrscheinlicher ist die funktionelle Relevanz einer Variante. Grenzwerte zwischen “neutral”-, “low”-, “medium”- und “high”-Vorhersagen sind 0,8, 1,94 bzw. 3,50. PMut-Scores [69] von 0 bis 0,5 werden als apathogen (“neutral”) und Scores von 0,5 bis 1 als pathogen (“disease”) interpretiert. GERP++ [71] misst die Konservierung einer Sequenz in 36 Säugetiergenomen. Scores reichen von -12,36 bis 6,18, wobei höhere Scores eine strikere Konservierung anzeigen. PhastCons- und PhyloP-Scores [70] basieren auf *multiple sequence alignments* von 100 Wirbeltiergenomen. Werte für die Scores reichen von 0 bis 1 für PhastCons und von -20 bis 9,87 für PhyloP. Höhere Scores weisen jeweils auf eine stärkere Konservierung der Sequenz hin.

---

## Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich für die Möglichkeit bedanken, die Dissertation am Friedrich-Baur-Institut im Labor für Molekulare Myologie unter sehr guten Arbeitsbedingungen durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jan Senderek für die Bereitstellung des Themas, die jederzeit sehr gute Betreuung und die kompetente fachliche Begleitung dieser Dissertation.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Manuela Wiessner für die intensive Einarbeitung, hervorragende Unterstützung und die schnelle und kompetente Hilfe bei vielen Fragestellungen bedanken.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Labors für Molekulare Myologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Ausgesprochenen Dank insbesondere an meine Familie und meinen Freund Christian für ihre anhaltende Motivation, ihr ausgeprägtes Interesse und die damit einhergehende Diskussionsbereitschaft sowie ihre große Unterstützung im Verlauf der Promotion.



---

## Eidesstattliche Versicherung

**Martin, Julia**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Identifizierung und Charakterisierung der ursächlichen Genmutation einer  
Form der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Pfaffenhofen, den 27.07.2019

---

Julia Martin